

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TRABAJO DE INVESTIGACIÓN DE GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
E INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

POR:

JOSE MARCO FADILLA GARCIA

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

JULIO 2000

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS



"EFECTO DE MIREZAS DE EXTRACTOS DE PLANTAS SOBRE LA PRESENCIA DE *Escherichia coli* 0157:H7
Y *Shigella sonnei* EN CARNE DE RES CONTAMINADA ARTIFICIALMENTE"

POR:

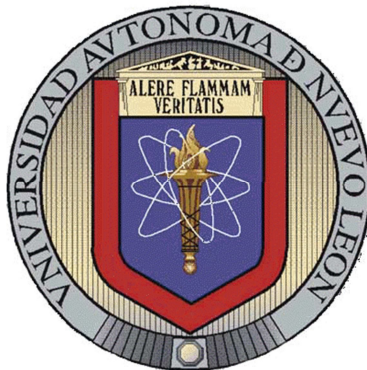
JOSE MACARIO PADILLA GARZA

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS

JULIO, 2010

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



“EFECTO DE MEZCLAS DE EXTRACTOS DE PLANTAS SOBRE LA PRESENCIA
DE *Escherichia coli* O157:H7 Y *Shigella sonnei* EN CARNE DE RES
CONTAMINADA ARTIFICIALMENTE”

Por

JOSE MACARIO PADILLA GARZA

Como requisito para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS

Julio, 2010

“EFECTO DE MEZCLAS DE EXTRACTOS DE PLANTAS SOBRE LA
PRESENCIA DE *Escherichia coli* O157:H7 Y *Shigella sonnei* EN CARNE DE RES
CONTAMINADA ARTIFICIALMENTE”

Comité de Tesis

Presidente: Dr. José Santos García Alvarado

Secretario: Dra. Licet Villarreal Treviño

Vocal: Dra. Norma Laura Heredia Rojas

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, bajo la dirección del Dr. José Santos García Alvarado y la codirección de la Dra. Norma Laura Heredia. Este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica de la UANL (PAICyT) (Proyecto No. 104751).

DEDICATORIA

A mi padre (que duerme, en la esperanza de ver a Jesucristo viniendo en gloria).
También dedico este trabajo y deseo darle las gracias a mi afectuosa madre por sus oraciones, su confianza en mí; y su consejo.

A mis hermanos: Juan Adalberto y Lucía Alejandrína por el apoyo moral que siempre me han brindado y a todas las personas que contribuyeron de una forma u otra en la realización de este trabajo.

De manera muy especial quiero dedicar y dar gracias a mi querida novia, Yesi, por estar conmigo en cada reto, impulsándome con su amor, cariño, apoyo continuo, consejo y paciencia. Te amo, eres la mujer cristiana que siempre soñé, y doy gracias a Dios por tu vida.

Has llenado mi corazón y me has alentado a asumir nuevos desafíos. Aún falta mucho por conquistar y lo vamos a hacer juntos, dando gloria solamente al único Dios real y verdadero.

AGRADECIMIENTOS

Gracias Señor por toda tu misericordia y amor que has manifestado a mi vida y a mi familia todos estos años. Gracias por tu aliento, tu afecto y tu cuidado.

Gracias por darme la oportunidad de este éxito, y dejarme ver hecho realidad lo que mi padre y yo soñamos años atrás. Sin tu consentimiento nada hubiera podido realizarse.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

Gracias al Dr. José Santos García Alvarado por creer en mí; y por darme la oportunidad de desarrollarme en la investigación. Gracias por permitirme contar siempre con usted, no solo como asesor, sino como amigo.

Gracias también a la Dra. Norma Laura Heredia Rojas, les damos gracias a Dios por sus vidas, sabemos que son el instrumento que Dios ha usado para impulsarnos a enfrentar nuevos desafíos y dar los pasos que nos han permitido madurar más en las diferentes áreas de nuestras vidas.

Agradezco a la Dra. Licet Villarreal Treviño por formar parte del Comité de Tesis, y por sus valiosas sugerencias, en la revisión del presente trabajo.

Agradezco al M.C. Eduardo Sánchez, a la M.C Sandra Castillo y al Biól. Esteban Maldonado por su valiosa consulta en el desarrollo de este trabajo. También debo agradecer al M.C. Ismael Malagón por sus aportes y ayuda en el análisis estadístico.

A mis compañeros de tesis Mayela, Aziel, Nydia y Juan a quienes les aprendí las técnicas, que debido a mi perfil, (que distaba mucho de lo que es un bacteriólogo) nunca había conocido.

Gracias al equipo de becarios: Wendy, Jesús, Brianda, Alany y Caro, son excelentes; un regalo de Dios.

Gracias a todos por darse a los demás desinteresadamente, estando siempre dispuestos a dar lo mejor.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
TABLA DE CONTENIDO.....	vii
LISTA DE TABLAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS	3
3. OBJETIVOS.....	4
3.1. Objetivo general	4
3.2. Objetivos particulares.....	4
4. ANTECEDENTES	6
4.1. Enfermedades transmitidas por alimentos.....	6
4.2. <i>Escherichia coli</i>	7
4.2.1. <i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC)	8
4.2.2. <i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC).....	9
4.2.3. <i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	9
4.2.4. <i>E. coli</i> de adherencia difusa (DAEC)	10

4.2.5. <i>E. coli</i> enteroagregativa (EAggEC)	10
4.2.6. <i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	10
4.3. <i>Shigella</i>	14
4.4. Usos de plantas	17
4.4.1. Generalidades	17
4.4.2. Antimicrobianos naturales de extractos de plantas	18
4.4.3. Actividad contra microorganismos enteropatógenos	21
4.4.4. Combinaciones de extractos de plantas para mejorar el efecto antimicrobiano	24
4.4.5. Técnicas para probar la actividad antibacteriana de compuestos de extractos de plantas	25
4.4.6. Principales compuestos con actividad antimicrobiana de origen vegetal	27
4.4.6.1. Alcaloides	27
4.4.6.2. Flavonas, flavonoides y flavonoles	27
4.4.6.3. Terpenoides y aceites esenciales	27
4.4.6.4. Lecitinas y polipéptidos	28
4.4.6.5. Fenólicos y polifenoles	28
4.4.6.6. Taninos	29
4.4.6.7. Quinonas	29
4.4.6.8. Cumarinas	30
4.5. La proteína verde fluorescente GFP y su aplicación	30
5. MATERIAL Y MÉTODOS	33

5.1.Cepas y condiciones de cultivo.....	33
5.2.Plantas en estudio.....	34
5.2.1. Preparación de los extractos.....	34
5.2.2. Determinación del rendimiento de los extractos obtenidos	36
5.3.Ensayo preliminar de la actividad antimicrobiana de los extractos de plantas	36
5.4.Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) de los extractos activos	38
5.5.Determinación del efecto sinérgico entre los extractos activos	38
5.6.Efecto de los extractos de plantas y sus mezclas en un modelo de carne de res	40
5.6.1. Muestra utilizada.....	40
5.6.2. Actividad antimicrobiana de los extractos de plantas sobre carne de res contaminada artificialmente.....	41
5.6.2.1.Carne molida de res	41
5.6.2.2.Pulpa de res	42
5.6.3. Búsqueda de <i>E. coli</i> O157:H7 o <i>S. sonnei</i> GFP	43
5.7.Análisis estadísticos	43
6. RESULTADOS.....	44
6.1.Ensayos preliminares de la actividad antimicrobiana de los extractos de plantas	44
6.2.Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB)	46
6.3.Determinación del efecto sinérgico de los extractos de plantas probados contra el crecimiento de <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>Shigella sonnei</i>	47
6.4.Actividad antimicrobiana de los extractos de plantas sobre carne	

de res contaminada.....	50
7. DISCUSIÓN	55
8. CONCLUSIONES	64
LITERATURA CITADA.....	66
RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.....	85

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Plantas utilizadas en este trabajo.....	35
2. Inhibición (en cm) de extractos de plantas contra el crecimiento de <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>S. sonnei</i>	44
3. Concentraciones mínimas bactericidas (CMB en mg/ml) de extractos de plantas contra el crecimiento de <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>S. sonnei</i>	46
4. Efecto de tratamientos con extractos combinados en el crecimiento de <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>Shigella sonnei</i> de acuerdo al CFB Índice.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Halos de inhibición de 4 extractos etanólicos y sus respectivos controles sobre el crecimiento de <i>E. coli</i> O157:H7	37
2. Esquema de la determinación de efectos entre los extractos probados.	39
3. Isoblograma de concentración fraccional bactericida (CFB) para la combinación de tomillo (<i>Tymus mastichina</i>) y orégano (<i>Lippia graveolens</i>) para eliminar <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>Shigella sonnei</i> en caldo Muller-Hinton	49
4. Viabilidad de <i>E. coli</i> O157:H7 por mezcla de extracto de tomillo (<i>Tymus mastichina</i>) y orégano (<i>Lippia graveolens</i>) en un modelo de carne molida de res.....	51
5. Viabilidad de <i>E. coli</i> O157:H7 por extracto de romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>) en un modelo de pulpa magra de res.	52
6. Viabilidad de <i>Shigella sonnei</i> por extracto de romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>) en un modelo de carne molida de res.....	53

7. Viabilidad de <i>Shigella sonnei</i> por extracto de romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>) en un modelo de pulpa magra de res	54
--	----

SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

Ag	Antígeno
NaCl	Cloruro de sodio
CMB	Concentración Mínima Bactericida
CFB	Concentración Fraccional Bactericida
°C	Grados centígrados o Celsius
g	Gramo (s)
GFP	Green fluorescent protein (proteína verde fluorescente)
h	Hora (s)
l	Litro (s)
log CFU/cm	Logaritmo de unidades formadoras de colonias por centímetro cuadrado
log UFC/ml	Logaritmo de unidades formadoras de colonias por mililitro
<	Menor que
>	Mayor que
≤	Menor o igual que
≥	Mayor o igual que
mDa	Mega Dalton
kDa	kiloDaltones
μ	Micra (s)
μL	Microlitro (s)
mg	Miligramo (s)
mg/l	Miligramo por litro (s)
mg/ml	Miligramo por mililitro (s)
nm	Nanómetros
-	Negativo
+	Positivo
pH	Potencial de Hidrógeno
%	Porcentaje
rpm	Revoluciones por minuto
UFC/g	Unidades formadoras de colonias por gramo
UFC/ml	Unidades formadoras de colonias por mililitro
v/v	Volumen/volumen

RESUMEN

Los alimentos, especialmente los cárnicos y sus derivados pueden ser acarreadores de microorganismos causantes de enfermedades conocidas como ETAs (enfermedades transmitidas por alimentos). Además, se sabe que algunos extractos de plantas pueden inhibir el crecimiento de bacterias patógenas de alimentos.

El presente estudio tuvo por objeto determinar la actividad antimicrobiana de extractos de plantas (solos y combinados) en la reducción de bacterias patógenas transmitidas por alimentos.

Se prepararon extractos etanólicos de 20 plantas y fueron evaluados contra el crecimiento de cepas de *Escherichia coli* O157:H7 y *Shigella sonnei*. Se determinó la concentración mínima bactericida (CMB) de los que dieron mejor actividad (mejorana, romero, tomillo y orégano) la cual varió entre 1 a 6.33 mg/ml para *E. coli*, y de 1 a 3.33 mg/ml para *S. sonnei*; y los efectos sinérgicos entre estos extractos, encontrando que de los extractos probados, para *E. coli* los extractos de mejorana/romero, mejorana/orégano, romero/tomillo, romero/orégano, tomillo orégano y para *S. sonnei* mejorana/romero, romero/orégano, tomillo/orégano dieron sinergismo. Únicamente para *S. sonnei* la combinación de mejorana/tomillo, mejorana/orégano y romero/tomillo tuvieron un efecto aditivo.

Se analizó la reducción de la población de *S. sonnei* y *E. coli* O157:H7 por efecto de los extractos y sus mezclas en un modelo de carne molida de res y trozos de pulpa de carne, los cuales fueron inoculados con dos concentraciones bacterianas. Cuando se inoculó a razón de 1 gramo con 10^6 UFC/ml, se encontró que el extracto de romero fue el más efectivo reduciendo 0.4 y 0.5 log la población de *S. sonnei* en la carne molida de res, y en pulpa de carne respectivamente. Para *E. coli*, la reducción en ambos productos fue de 0.4 log al día 3 del ensayo. No se observó reducción significativa para ningún ensayo.

ABSTRACT

Food, especially meat and its derivatives may be carriers of disease-causing microorganisms. Moreover, it is known that some plant extracts can inhibit the growth of food pathogens.

The present study aimed to assess the antimicrobial activity of plant extracts (alone and combined) to inhibit growth of foodborne pathogens in media and in meats.

Ethanollic extracts were prepared from 20 plants and were evaluated against growth of strains of *E. coli* and *S. sonnei*. Minimum bactericidal concentration (MBC) was determined for the extracts who gave the best activity (marjoram, rosemary, thyme and oregano). MBC for these extracts ranged from 1 to 6.33 mg/ml for *E. coli*, and 1 to 3.33 mg/ml for *S. sonnei*. Synergism between the extracts was determined. The mixture of extracts tested for *E. coli*: marjoram/rosemary, marjoram/oregano, rosemary/thyme, rosemary/oregano, thyme/oregano and *S. sonnei* marjoram/rosemary, rosemary/oregano, thyme/oregano were synergistic. For *S. sonnei* the mixtures of marjoram/thyme, marjoram/oregano and rosemary/thyme had an additive effect.

The reduction of *S. sonnei* and *E. coli* O157: H7 by plant extracts alone and combined was analyzed in ground and pulp beef. Two inoculums levels were used. When one gram with 10^6 CFU/ml at rate were inoculated, rosemary extract reduced the population of *S. sonnei* in ground beef and meat pulp by 0.4 and 0.5 log, respectively. For *E. coli*, reduction in both products was 0.4 log on day 3 of the test. No significant reduction was observed for none assay.

1. INTRODUCCIÓN

Los alimentos son fundamentales para la vida, encontrándose entre ellos a la carne en sus diferentes variedades. No obstante, si no se toman precauciones en cuestión de sanidad, pueden ser causantes de enfermedades conocidas como Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs). Las ETAs son un conjunto de enfermedades que resultan de la ingestión de alimentos o agua contaminados con microorganismos en cantidades suficientes para causar enfermedad al consumidor (WHO, 1999).

Los síntomas de las ETAs son variables y dependen del tipo de organismo, la cantidad de alimento contaminado que se consume, y del estado inmunológico o físico de la persona (Oquendo, 2006).

Los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) en Estados Unidos han establecido que se producen 73,000 casos de infecciones anuales debido a *E. coli* O157:H7 (Mead *et al.*, 1999), y 18,000 infecciones a causa del miembros del género *Shigella* tan solo en EUA (MDH, 2009).

En la actualidad los consumidores buscan alimentos lo más naturales posible (Rojas, 2006), debido a esto, la industria de conservadores naturales está alcanzando una preferencia muy exitosa (Fisher y Philips, 2008).

Una gran cantidad de derivados de plantas se han utilizado para la conservación de alimentos desde hace muchos años, por ejemplo el uso de especies o condimentos. Se ha establecido que algunos extractos de plantas tienen propiedades antimicrobianas, y esto se puede atribuir a algunos de sus componentes tales como aceites esenciales, terpenos y flavonoides (Arcaraz *et al.*, 2000).

Debido a que todavía, aun con los métodos actuales de control (tratamientos térmicos, agua, antimicrobianos químicos y métodos mecánicos), las enfermedades provocadas por enterobacterias se siguen produciendo, la búsqueda de alternativas eficaces de control de estos patógenos es un tema actual (Northcutt *et al.*, 2005), y además de que existe poca información del efecto de extractos de plantas o sus combinaciones para el control de enteropatógenos en un modelo alimentario, por lo que esta investigación pretendió abordar este aspecto.

2. HIPÓTESIS

Los extractos de plantas en estudio, solos o en combinación, pueden inhibir o reducir las poblaciones de *E. coli* O157:H7 y *S. sonnei in vitro* y en un modelo alimentario de carne de res.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Determinar la actividad antimicrobiana de extractos de plantas y sus combinaciones en la reducción de poblaciones de *E. coli* O157:H7 GFP y *S. sonnei* GFP *in vitro* y en un modelo de carne de res.

3.2. Objetivos Particulares

1. Determinar el efecto antimicrobiano de 20 plantas comestibles sobre el crecimiento de *E. coli* O157:H7 y *S. sonnei*.
2. Determinar la concentración mínima bactericida (CMB) de las plantas activas sobre *E. coli* O157:H7 y *S. sonnei*.
3. Establecer si combinaciones de los extractos activos poseen efecto sinérgico para inhibir el crecimiento de *E. coli* O157:H7 y *S. sonnei*.

4. Determinar la efectividad de las mezclas de extractos para inhibir el crecimiento de *E. coli* O157:H7 y *S. sonnei* en un modelo alimentario de carne de res.

4. ANTECEDENTES

4.1. Enfermedades Transmitidas por Alimentos

La inocuidad de los alimentos es una preocupación creciente para el consumidor y la industria de alimentos. Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son de mucha importancia para la salud pública, debido a que causan pérdidas económicas cuantiosas para el sector agrícola-alimentario. Tan solo en los Estados Unidos, las ETAs son responsables de 76 millones de casos de enfermedad cada año (Mead *et al.*, 1999). *Salmonella*, *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC; principalmente el serotipo O157:H7) y *Listeria monocytogenes* son las bacterias patógenas más predominantes (ERS/USDA, 2001).

El consumo de alimentos refrigerados listos para consumo puede ser una fuente potencial de infecciones de *Salmonella* Typhimurium, *L. monocytogenes*, y *E. coli* O157:H7. Por ejemplo, tan solo en el año 2007, se reportó que 5.7 millones de libras de productos de carne molida fresca y congelada fueron contaminadas con *E. coli* O157:H7

(FSIS/USDA, 2007). Además, la presencia y crecimiento de microorganismos en los alimentos pueden causar deterioro prematuro (Bajpai *et al.*, 2008).

Los patógenos que portan los animales para consumo, tales como ganado y aves de corral pueden contaminar directa o indirectamente carnes crudas y procesadas. La contaminación de la piel y la diseminación de patógenos fecales contribuyen a la contaminación de las canales de bovinos (Elder *et al.*, 2000; Koohmaraie *et al.*, 2005), mientras que la piel y las plumas contaminadas con heces sirven como mayores fuentes de contaminación en aves de corral (Doyle y Erickson, 2006).

El procesado de carne puede extender adicionalmente la contaminación microbiana, así como un control de temperatura inadecuado puede permitir incrementar en número a los patógenos (Doyle *et al.*, 2001). Sin embargo, se pueden implementar medidas de reducción de riesgos para minimizar el riesgo de infección.

4.2. *Escherichia coli*

E. coli es una de las muchas bacterias que existen en el intestino de humanos y en la mayoría de animales, por lo que se le considera un microorganismo indicador de contaminación fecal cuando está presente en agua y alimentos (Acuña *et al.*, 2002). Esta bacteria ayuda a mantener el equilibrio de la microflora natural contra bacterias dañinas.

Escherichia coli perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Son bacilos Gram negativos, móviles, fermentadores de lactosa y citrato negativo. Algunos miembros de este género no solamente causan enfermedades diarreicas, sino también otros síntomas como infección urinaria, meningitis, e incluso sepsis. Para su clasificación serológica, el antígeno O somático integrante del lipopolisacárido (LPS) las distingue en serogrupos, y el antígeno H flagelar permite completar su categorización en serotipos.

Las cepas de *E. coli* que provocan enfermedad diarreica se clasifican en los grupos patógenos: enteropatógeno (EPEC), enterotoxigénico (ETEC), enteroinvasivo (EIEC), de adherencia difusa, enteroagregativo (EaggEC) y enterohemorrágico (VTEC) (Doyle *et al.*, 2001).

4.2.1. *E. coli* Enteropatógena (EPEC)

Estos organismos pueden producir diarrea grave. Los principales serogrupos relacionados a enfermedades son O55, O86, O111ab, O119, O125ac, O126, O127, O128ab y O142. El reservorio más importante de estas bacterias es el ser humano. Se ha determinado que las EPEC inducen lesiones de fijación cuando se adhieren a tejidos, por lo tanto tiene la capacidad de invadir células epiteliales. Algunas pueden incluso producir toxinas (Doyle *et al.*, 2001).

4.2.2. *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC)

Es la causa principal de diarrea infantil en países en vías de desarrollo, además de ser a menudo responsables de la diarrea del viajero (Doyle *et al.*, 2001). Las ETEC colonizan el intestino delgado por medio de fimbrias y producen una enterotoxina termolábil y/o termoestable que provoca la acumulación de líquido lo que produce una respuesta diarreica. Entre los serogrupos más frecuentes se encuentran O6, O8, O15, O20, O25, O27, O63, O78, O85, O115, O128ac, O148, O159, y O167 (Doyle *et al.*, 2001).

4.2.3. *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC)

Producen una diarrea y disentería parecida a la producida por *Shigella* spp. Invaden el interior de las células epiteliales del colon en donde se multiplican. Al igual que *Shigella* spp., la *E. coli* EIEC se encuentra relacionada con un plásmido de 140 kDa que codifica para algunas proteínas de membrana externa (OMPs) involucradas en la capacidad invasora. Se ha establecido que la antigenicidad de las proteínas y la de los antígenos O se encuentran muy relacionadas con las presentes en *Shigella* spp. (Doyle *et al.*, 2001).

El lugar donde se aloja la bacteria es el colon, donde las células epiteliales son invadidas por EIEC. Los serogrupos relacionados con la enfermedad incluyen O28ac,

O29, O112, O124, O136, O143, O144, O152, O164 y O167. De los cuales el O124 es el más frecuente (Doyle *et al.*, 2001).

4.2.4. *E. coli* de Adherencia Difusa (DAEC)

En México se ha relacionado con diarrea infantil. Puede producir diarrea ligera con sangre o leucocitos fecales. Se pueden identificar por la característica difuso-adherente a líneas celulares como HEp-2 o HeLa. Estas cepas generalmente no elaboran toxinas, no tienen capacidad de invadir células epiteliales y no presentan plásmidos del factor de adherencia como los EPEC (Doyle *et al.*, 2001).

4.2.5. *E.coli* Enteroagregativa (EAggEC)

Se han relacionado con diarrea persistente en niños y bebés. Estas cepas son particularmente diferentes a otras bacterias patógenas de *E. coli* por su capacidad de adherencia agregativa en células Hep-2. Se necesita una gran cantidad de información epidemiológica para tener en claro su importancia como agente de enfermedad diarreica (Doyle *et al.*, 2001).

4.2.6. *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC)

E. coli O157:H7 causa cerca de 20, 000 enfermedades y 250 muertes anualmente en los Estados Unidos, y también es un importante patógeno en Canadá y algunos países Europeos (Peacock *et al.*, 2001). A la fecha, han sido reportados en más de 30 países, sobre todo brotes asociados con el consumo de carnes mal cocidas, especialmente carne molida o carnes de hamburguesa (Nadarajah *et al.*, 2005).

El tipo patogénico enterohemorrágico, que incluye al serotipo O157:H7, origina una infección intestinal en los humanos que puede ser mortal. Se puede diferenciar de otras *E. coli* por la producción de potentes toxinas que dañan el revestimiento de la pared intestinal y causan diarrea con sangre (Jay, 2000).

Algunos serotipos de *E. coli* como 0:26, 0:111 O:157 tienen en común con cepas de *S. dysenteriae* tipo I, la producción toxinas o verotoxinas. A este grupo toxigénico se le han conocido la producción de varios tipos, la VT1, la VT2, VT2vha y VT2vhb que son semejantes a la toxina Shiga. *E. coli* serotipo O157:H7 es una variedad no frecuente de *E. coli*, normalmente no es habitante del intestino de animales, incluyendo a humanos (FDA, 2002).

La infección por VTEC puede ir desde aquella sin síntomas, hasta casos severos en donde se presenta diarrea líquida hasta aquella de diarrea con sangre o colitis

hemorrágica. Además se pueden presentar algunas complicaciones serias como el síndrome urémico hemolítico (HUS) (Paton y Paton 1998), el cual se caracteriza por falla renal, y anemia hemolítica. Se ha establecido que esta complicación ocurre en más de 15% de pacientes con colitis hemorrágica y puede llevar a la pérdida permanente de función renal. En ancianos, la combinación de HUS con fiebre y la disfunción neurológica conocida como trombocitopenia trombótica purpura, puede alcanzar una mortalidad de 95%, sin embargo con un diagnóstico temprano y tratamiento se estima una sobrevivencia del 80-90% (Abumuhor y Kearns, 2002).

Desde su identificación como patógeno en 1982, EHEC O157:H7 ha ocasionado una serie de brotes, de los cuales están bien documentados en Canadá, Japón, Reino Unido y Estados Unidos (Bettelheim, 2003).

La dosis infectiva de este microorganismo se estima que es baja ($<10^2$), tal como se presenta para *Shigella*, y su transmisión puede ser por vía fecal-oral, Los rumiantes en general, y particularmente el ganado vacuno, ha sido señalado como el principal reservorio de EHEC, y se ha encontrado en el 75% del ganado lechero y el 63% de engorda (Grauke, *et al.*, 2002); sin embargo, también se ha establecido que el ganado ovino es excretor de estos microorganismos (Padola *et al.*, 2004; Blanco *et al.*, 2004; Gómez *et al.*, 2002). Este patógeno se mantiene en el intestino de los rumiantes 30 días en promedio, aunque en algunos de ellos, la bacteria puede albergarse por un año o más (Grauke, *et al.*, 2002).

Distintos alimentos como carne molida y productos cárnicos crudos o insuficientemente cocidos, hamburguesas, embutidos fermentados, lácteos no pasteurizados, mayonesa, jugos de manzana no pasteurizados y vegetales tales como lechuga, germinados de soya y alfalfa, entre otros, han sido señalados como fuente de contaminación en casos esporádicos o brotes asociados a EHEC. Su sobrevivencia se ve favorecida a la resistencia de la bacteria a los ácidos, pudiendo sobrevivir en alimentos fermentados (Gómez *et al.*, 2002).

Otras formas de transmisión de este patógeno incluyen a la contaminación cruzada durante la preparación de alimentos, al contacto directo hombre-animales, y persona-persona, y por la vía fecal-oral, debido a las bajas dosis infectivas (0.9 a 4.3 UFC/g) que posee este grupo bacteriano (Paytton-Pruett *et al.*, 2002). El Servicio de Inocuidad e Inspección es la Agencia de Salud del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) clasificó en 1994 a *E. coli* O157:H7 como un adulterante de la carne de res molida cruda, congelada o cocinada. Aunque anteriormente había habido brotes relacionados con bacterias patógenas de alimentos, era la primera vez que un organismo regulador declaró que una bacteria patógena podía considerarse también como “adulterante”.

La incidencia de este patógeno varía con la época del año, siendo mayor durante el verano (LeJeune *et al.*, 2004). Se ha estimado que un 86% de los brotes originados en los Estados Unidos por *E. coli* O157:H7 es en los meses de mayo a octubre. Se cree que esto es debido al aumento en el consumo de carne de res molida o en cortes y a la época

en que se cocina al aire libre, favoreciendo en muchos casos una cocción inadecuada. Por otra parte, también aumenta durante los meses de calor lo cual puede ser debido al mal manejo de los alimentos, como abuso de temperatura y contaminación cruzada (Doyle *et al.*, 2001).

E. coli O157:H7 crece en un rango de condiciones muy extensas, sobreviviendo a temperaturas de congelación y rangos de pH desde 4.4 a 9. La temperatura óptima de crecimiento es 37°C, sin embargo puede crecer en un rango entre 7 a 44.5°C. Se ha encontrado que a temperaturas de 4 a 5°C no se reduce significativamente la población bacteriana hasta por 7 días (Pearce *et al.*, 2004).

Un estudio que se llevó a cabo en mayonesa demostró que *E. coli* O157:H7 sobrevivió en medios ácidos (pH 3.7), y una temperatura de 5° a 7°C durante 35 días, sin embargo, cuando el producto se almacenó a 25°C, la bacteria no fue detectada después de 72 h (Doyle *et al.*, 2001).

También se comprobó que esta bacteria toleraba un choque osmótico ya que al ser expuesta a concentraciones de 4.5% y 6.5% de NaCl, se retrasó la fase lag, sin embargo, el microorganismo fue capaz de recuperarse.

4.3. *Shigella*

La shigelosis es una enfermedad infecciosa originada por miembros del género *Shigella*. Los síntomas de las personas infectadas se presentan después de 1 o 2 días de haber consumido el alimento contaminado. Las especies del género *Shigella* son bacilos Gram (-), no móviles, y no fermentadores de lactosa y son miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

Este género comprende cuatro especies: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, y *S. sonnei*. Todas las especies son patógenas, capaces de causar diferentes cuadros clínicos que van desde una infección asintomática o una diarrea leve hasta cuadros más graves como disentería bacilar o shigelosis que consiste principalmente de diarrea con o sin sangre, con o sin moco, fiebre y calambres abdominales. Adicionalmente se ha determinado que *S. dysenteriae* tipo I produce la toxina Shiga, una de las toxinas más potentes conocidas que puede causar grandes brotes de disentería generalmente en condiciones pobres de higiene (WHO, 2005). En general, *S. sonnei* y *S. boydii* tienden a causar una enfermedad más leve que las otras especies (Janda y Abbot, 2006).

Las tres especies predominantes que en general son responsables de la mayoría de casos de shigelosis, son *S. sonnei*, *S. flexneri* 2a y *S. dysenteriae* tipo I (Sur *et al.*, 2004). Los humanos son su principal reservorio. Las cepas de *S. dysenteriae* (causante de cuadros clínicos más graves) y *S. flexneri* son las principales responsables de causar infecciones, y son endémicas en países en vías de desarrollo causando una mayor mortandad (son epidémicas), mientras que en países occidentales, la mayoría de las infecciones son causadas por *S. boydii* (serogrupo C, 19 serotipos) y *S. sonnei*, y por las

variedades importadas (por inmigrantes de países donde la shigelosis es endémica) (Ekdahl y Andersson, 2005).

S. sonnei (serogrupo D, un serotipo) es responsable de un cuadro clínico ligero, más comúnmente infectando a viajeros de países del Oeste (Janda y Abbot, 2006). *S. flexneri* (serogrupo B, consiste de 8 serotipos con varios subtipos) es endémico en los países en vía de desarrollo y causan más mortalidad que las otras especies. *S. dysenteriae* (serogrupo A, consiste de 15 serotipos) causa grandes epidemias en muchos países en desarrollo.

La incidencia global de infecciones de *Shigella* han sido estimadas de 80 – 165 millones de casos anualmente, donde el 99% de ellos ocurren en niños menores de 5 años en países en vías de desarrollo (WHO, 2005). La dosis infectiva puede ser menor a 10 microorganismos, facilitándose así la propagación persona a persona (DuPont *et al.*, 1989).

Aunque la gastroenteritis causada por *Shigella* spp. es normalmente limitada por sí misma, los pacientes son frecuentemente tratados con agentes antimicrobianos para reducir la duración de la enfermedad y el periodo de la excreción de *Shigella* después que los síntomas pasaron (Heymann, 2004). Sin embargo, las cepas de *Shigella* tienen un rápido desarrollo de resistencia a los antibióticos comúnmente utilizados (ampicilina y trimetoprima-sulfametoxazol) (Niyogi, 2005).

4.4. Usos de Plantas

4.4.1. Generalidades

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha catalogado más de 20,000 especies de plantas con propiedades medicinales que proveen tratamientos para dolencias tales como neumonía, úlceras, diarrea, bronquitis, resfriados y enfermedades del tracto respiratorio (Aridogan *et al*, 2002). Una de las muchas propiedades de las plantas se debe a compuestos presentes en ellas, tales como los aceites esenciales que son mezclas químicas complejas, típicamente compuestas de más de un ciento de compuestos, los cuales son responsables en muchos de los casos de aromas característicos de las plantas (Aridogan *et al*, 2002).

Los remedios con plantas están siendo reconocidos por científicos como una importante alternativa de bajo costo para competir con antibióticos producidos industrialmente, los cuales no están disponibles para todos los que lo necesitan debido a sus altos costos (Cáceres *et al.*, 1993a; Vieira *et al.*, 2001).

Los extractos de plantas han sido utilizados por una amplia variedad de propósitos por miles de años (Jones, 1996). La utilización de estos varían desde el uso del rosal y cedro en perfumería, hasta saborizantes de bebidas como lima, cañabeja o aceite de baya de enebrina (Lawless, 1995), y la aplicación de aceite de zacate limón

para la conservación de cosechas almacenadas (Mishra y Dubey, 1994). En particular, la actividad antimicrobiana de extractos de plantas ha sido la base de muchas aplicaciones, incluyendo la conservación de alimentos crudos y procesados, usos farmacéuticos, en medicina alternativa y terapias naturales (Reynolds, 1996; Lis-Balchin y Deans, 1997).

México tiene una extensa variedad de plantas; es el cuarto país más rico del mundo en este aspecto. Algunas 25,000 especies están registradas, y se piensa que hay aproximadamente 30,000 no descritas aun (Adame y Adame, 2000), de las cuales se desconocen sus propiedades.

4.4.2. Antimicrobianos Naturales de Extractos de Plantas

Las plantas son una fuente de moléculas biológicamente activas. Aunque la mayoría de estas no han sido totalmente descubiertos, aquellos descritos, dan una idea del potencial que aún está por estudiarse (Balandrin *et al.*, 1985).

Se ha establecido que muchos de los metabolitos secundarios de las plantas, poseen sustancias activas con actividad antimicrobiana, que pueden ser usados para controlar agentes patógenos y deteriorantes (Tepe *et al.*, 2004; Kalchayanand *et al.*, 2009). Debido a esto, el uso de fitoquímicos como agentes antimicrobianos naturales comúnmente llamados “biocidas” ha ganado popularidad (Smid y Gorris, 1999).

Una ventaja de los agentes naturales es que ellos no contribuyen a la “resistencia de antibióticos”, un fenómeno comúnmente encontrado con el uso de antibióticos sintéticos a lo largo del tiempo (Vukovic *et al.*, 2007).

La investigación sobre métodos biológicos alternativos para mejorar la conservación y/o reducir los patógenos en los alimentos es un área activa de investigación. Numerosas intervenciones han sido reportadas para la reducción de patógenos en las etapas pre y post del sacrificio de animales y en las fases de procesamiento de productos cárnicos. Entre estos métodos se incluyen el uso de compuestos orgánicos, vacunas y bacteriófagos así como el uso de bacterias antagónicas (Callaway *et al.*, 2004; Joerger, 2003; Koohmaraie *et al.*, 2005; LeJeune y Wetzel, 2007), adición de metabolitos antimicrobianos activos tales como ácidos orgánicos (láctico y acético), peróxido de hidrógeno, o bacteriocinas (Holzapfel *et al.*, 1995; Kostrzynska y Bachand, 2006).

Desde tiempos remotos las especies han sido utilizadas como conservadores. Los aceites esenciales (AE) y las oleorresinas son muy utilizados en la industria alimentaria. Singh *et al.*, (2008) estudiaron la actividad antimicrobiana de estos dos compuestos y sus propiedades antioxidantes, encontrando que los componentes fenólicos presentes fueron los responsables de la actividad antioxidante, y de su actividad antimicrobiana cuando fueron probados contra varias cepas de bacterias y hongos patógenos de alimentos.

Estudios llevados a cabo *in vitro* han indicado la eficacia de los aceites esenciales y oleorresinas como antibacterianos naturales (Holley y Patel, 2005; Sandasi *et al.*,

2008). Sin embargo también se ha establecido que es necesario el uso de mayores concentraciones de los extractos en los alimentos para arrojar los mismos resultados de los estudios *in vitro*, sin embargo, en ocasiones a estas concentraciones eficaces se afectan las propiedades sensoriales de los alimentos tratados, por lo que para que el uso de estos extractos pueda ser aplicado con éxito a escala industrial como bactericidas, debe tenerse en cuenta el impacto sensorial. Por lo regular, la actividad de los extractos puede afectarse por algunos constituyentes de los alimentos. Se cree que las grasas y proteínas en concentraciones altas protegen a las bacterias de la actividad microbiana de los extractos (Moreira *et al.*, 2007).

También se ha visto que a mayor cantidad de nutrientes en los alimentos, en comparación con la que presentan los medios artificiales usados en laboratorio, puede favorecer la reparación de células bacterianas dañadas por la actividad de los extractos (Gutierrez *et al.*, 2008).

Se conoce que algunos componentes de productos naturales tales como carotenoides, flavonoides, antocianinas y compuestos fenólicos funcionan como antioxidantes. En particular, ha sido reportado que existen antioxidantes potenciales en un número de extractos de plantas incluyendo uvas (Lapidot *et al.*, 1999), té verde (Frankel *et al.*, 1997), grosella negra o zarzaparrilla negra (Nielsen *et al.*, 2003), tomate (Gahler *et al.*, 2003) y romero (Frankel *et al.*, 1996; Richheimer *et al.*, 1996). Aunque el efecto antioxidante del romero ha sido investigado extensivamente en varias muestras (Banias *et al.*, 1992; Wada y Fang, 1992), no hay información del efecto combinado con otros extractos en un sistema modelo de carne fresca.

4.4.3. Actividad contra Microorganismos Enteropatógenos

Actualmente se presenta una ideología de regreso a la naturaleza y una cierta desconfianza en los avances científico-tecnológicos y en el uso de productos sintéticos que se consideran algo ‘tóxicos’ o sintéticos, y que pueden ser dañinos a la salud, por lo que ha crecido notablemente el mercado de alternativas naturales de origen vegetal.

Se han realizado numerosos estudios de la actividad de extractos de plantas contra cepas enteropatógenas. Ponce *et al.*, (1998) evaluaron la actividad antibacteriana *in vitro* de 249 extractos contra *Staphylococcus aureus* y *S. flexneri*. Del total de plantas estudiadas, 115 (78.2%) de ellas a las cuales se les realizaron extractos etanólicos (70%) presentaron actividad contra *S. aureus*, mientras que solo 15 (10.2%) extractos fueron activos contra *S. flexneri*. Cuando probaron extractos acuosos de 22 plantas (14.9%), tuvieron actividad contra *S. aureus* y 9 (6.1%) contra *S. flexneri*.

En 1997, Martínez *et al.*, encontraron que el extracto etanólico de hojas de guayaba, poseía actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* y *P. aeruginosa*. Este extracto presentó mayor actividad que la que había sido reportada cuando se utilizaba acetona n-hexano como solvente de extracción (NAPRALERT, 1990), pero la actividad fue inferior cuando la extracción se realizaba con metanol (Cáceres *et al.*, 1993b).

La validación de la medicina tradicional mediante la búsqueda de los compuestos con actividad antimicrobiana ha sido estudiada desde hace tiempo. Bayoub *et al.*, (2010) después de probar los extractos de 13 plantas contra microorganismos enteropatógenos, como *E. coli*, encontraron que los extractos etanólicos (90%) de clavo, tomillo silvestre, geranio y tomillo mostraron una buena inhibición contra el microorganismo, en tanto que el extracto de menta mostró baja inhibición del crecimiento contra este microorganismo.

Muchos reportes han mostrado que el tomillo posee propiedades antimicrobianas (Alves *et al.*, 2000; Al-Tarawneh, 2004; Bounatirou *et al.*, 2007; Ebrahimi *et al.*, 2008). Recientemente Qaralleh *et al.*, (2009) llevaron a cabo un estudio para evaluar la actividad contra el crecimiento de bacterias como *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* por extractos acuosos y orgánicos (etanol, diclorometano, hexano) de hojas y tallos de tomillo. Los resultados mostraron que los extractos etanólicos tuvieron una buena actividad antibacteriana, sin embargo fue mejor la encontrada para los aceites esenciales. Estos resultados también concuerdan con lo obtenido en compuestos presentes de estos extractos como el timol y carvacrol que mostraron poseer una fuerte actividad de inhibición del crecimiento contra *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. sonnei* y *E. coli* (Fan y Chen, 2001; Ebrahimi *et al.*, 2008).

Cuervo (2007), encontró que el extracto de flor de jamaica era efectivo para inhibir o reducir el crecimiento de *Salmonella*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*, obteniendo reducciones del crecimiento de más de 6.0 log cuando los patógenos estuvieron en contacto con 58.4 mg/ml del extracto acuoso a 25°C por 12 h.

En el 2006, Akinyemi *et al.*, investigaron la actividad antibacteriana de la alcalifa (*Alcalypha wilkesiana*), grano de pavorreal (*Phyllanthus discoideus*), y la palma aceitera (*Trema guineensis*) contra bacterias enteropatógenas como *E. coli*, *S. enteritidis* y *S. aureus*. Los resultados mostraron que los extractos crudos acuosos y etanólicos fueron capaces de inhibir el crecimiento de las cepas probadas, en donde los extractos etanólicos mostraron mejor actividad.

Ravikumar Patil *et al.*, (2007) probaron el extracto etanólico de la adelfa amarilla (*Thevetia peruviana*) contra varios microorganismos patógenos, y encontraron una buena actividad contra el crecimiento de *E. coli*, *Enterobacter aerogenes* y *Alcalilgenes faecalis*. En este mismo año, Xujian y Wu (2007) observaron en un estudio que el concentrado de arándano aplicado en carne molida de res fue efectivo para inhibir el crecimiento de *E. coli* O157:H7.

Del mismo modo, Suresh *et al.*, (2008) investigaron la actividad antibacteriana del extracto etanólico obtenido de la hierba de San Pablo (*Rauvolfia tetraphylla*) contra algunas especies de bacterias y hongos, obteniendo la mejor inhibición del crecimiento contra *E. coli*, *E. aerogenes* y *A. faecalis*.

Mohana *et al.*, (2008) analizaron la actividad de extractos acuosos y orgánicos (éter de petróleo, benceno, cloroformo, metanol y etanol) contra el crecimiento de microorganismos patógenos tales como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *S. Paratyphi A*, *S. flexneri*, *S. Typhi*, *S. Typhimurium*, *S. sonnei*, *S. aureus* y *S. faecalis*, los cuales fueron inhibidos por los extractos de nacascolo (*C. coriaria*).

4.4.4. Combinaciones de Extractos de Plantas para Mejorar el Efecto Antimicrobiano

Desde hace tiempo algunos investigadores se han dado a la tarea de buscar combinaciones o mezclas de extractos o componentes de extractos naturales para ser utilizados en modelos alimentarios, tal es el caso de Lin *et al.*, (2004) quien probó compuestos fenólicos de orégano y arándano con una concentración total de 0.1 mg/ml (75% de orégano, 25% de arándano) en filete de pescado y bistec de res a una temperatura de 4°C contra *Listeria monocytogenes*, encontrando que en relación al control obtuvo una reducción de 2.3 y 2.8 log respectivamente. En bistec de res 1.5 log y 2.5 log comparado con el tratamiento del extracto puro de orégano y arándano, y en filete de pescado de 0.8 y 1.6 log respectivamente (Lin *et al.*, 2004).

Del mismo modo, Valtierra-Rodríguez *et al.*, (2009) evaluó la actividad antimicrobiana de mezclas binarias de extractos de plantas tales como los extractos de

limón, ciruela y cáscara de naranja contra *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* en recortes de piel de pollo observando que las mezclas redujeron de manera significativa las poblaciones de *Campylobacter* después de 48 h a 4°C (Valtierra-Rodriguez *et al*, 2009).

4.4.5. Técnicas para Probar la Actividad Antibacteriana de Compuestos de Extractos de Plantas

- a) Método de difusión en disco. La búsqueda actividad antibacteriana por extractos de plantas es frecuentemente realizada por el método de difusión en disco, donde discos de papel filtro son empapados con el extracto a probar y posteriormente tendido en la superficie de una placa con agar previamente inoculada con el microorganismos a probar (Aureli *et al.*, 1992). Esto se utiliza generalmente como un sistema preliminar de tamizaje para posteriormente realizar estudios más detallados. Factores tales como el volumen del extracto puesto en los discos de papel, el grosor de la capa de agar y la utilización de disolventes, hace que varíen considerablemente estos ensayos.
- b) Prueba de pozo en agar. En esta prueba, los extractos son depositados dentro de pozos recortados dentro del agar y puede ser usado como método de tamizaje cuando son investigados preliminarmente extractos de plantas contra diferentes microorganismos (Deans y Ritchie, 1987; Dorman y Deans, 2000). Para que el crecimiento de algunos microorganismos sea más fácil de

visualizar, puede ser añadida una solución incolora de cloruro de trifeníl tetrazolio al medio de crecimiento (Elgayyar *et al.*, 2001; Mourey y Canillac, 2002) que cambia a color rojo por la liberación de protones de las células vegetativas.

- c) Método de microdilución en caldo. La fuerza de la actividad antibacteriana se puede determinar colocando diluciones dobles del extracto en una microplaca de 96 pocillos con medio líquido estéril. Posterior a esto se inocula con 1% v/v sobre cada celda o pocillo (Hammer *et al.*, 1996). La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determina por la concentración más baja en la cual no permite crecimiento visual (no turbidez) de los pocillos (Hammer *et al.*, 1996). La concentración mínima bactericida (CMB) se determina subcultivando la prueba de dilución en medio sólido fresco y que después de 24h no presente crecimiento microbiológico (Akinyemi *et al.*, 2006).
- d) El método de dilución en agar consiste en preparar diluciones seriadas dobles del extracto en placas Petri con agar. Posterior a esto se secan a 35°C antes de la inoculación de cada organismo. Como control positivo se preparan el agar sin el extracto. Las placas son incubadas, y después de 24h se obtiene la concentración mínima inhibitoria (CMI) en las placas con más baja concentración del extracto que inhibe el crecimiento visible (Hammer *et al.*, 1999).

4.4.6. Principales Compuestos con Actividad Antimicrobiana de Origen Vegetal

4.4.6.1. Alcaloides

Los alcaloides son compuestos heterocíclicos nitrogenados. El primer alcaloide utilizado en medicina fue la morfina (proviene del griego morfeus, dios de sueños), aislado en 1805 del somnífero opio amapola. La codeína y la heroína son derivados de la morfina (Fessenden y Fessenden, 1982). Los alcaloides diterpenoides, comúnmente aislados de las plantas de las *Ranunculaceae* o familia de ranúnculos son comúnmente encontrados con propiedades antimicrobianas (Omukoli *et al.*, 1997).

4.4.6.2. Flavonas, Flavonoides y Flavonoles

Los flavones son estructuras fenólicas que contienen un grupo carbonil. La adición de un grupo 3-hidroxi produce un flavonol (Fessenden y Fessenden, 1982). Los flavonoides son también sustancias fenólicas hidroxiladas pero ocurren como unidad C6-C3 ligada a un anillo aromático. Su actividad es probablemente debido a su habilidad de formar complejo con paredes celulares de bacterias. Los flavonoides más lipofílicos pueden también impedir la formación o reparación de las membranas microbianas (Tsuchiya *et al.*, 1996).

4.4.6.3. Terpenoides y Aceites Esenciales

La fragancia de las plantas es llevada en quintaesencia, o la fracción de aceite esencial. Estos aceites son metabolitos secundarios que son altamente enriquecidos en compuestos basados en una estructura de isopreno. Cuando los compuestos contienen elementos adicionales, usualmente oxígeno, ellos son nombrados terpenoides. Los terpenos o terpenoides son activos contra bacterias (Amaral *et al.*, 1998), hongos (Ayafor *et al.*, 1994) y virus (Fujioka y Kashiwada, 1994).

4.4.6.4. Lecitinas y Polipéptidos

Los péptidos que son inhibitorios sobre microorganismos están frecuentemente cargados positivamente y contienen enlaces disulfuro. Su mecanismo de acción puede ser la formación de canales iónicos en la membrana microbiana (Zhang y Lewis, 1997) o inhibición competitiva de adhesión de proteínas microbianas para receptores polisacárido hospederos (Sharon y Ofek, 1986). Las moléculas de lecitina más largas, las cuales incluyen lecitinas manosa específica de muchas plantas son inhibitorias a proliferación viral (Favero *et al.*, 1993).

4.4.6.5. Fenólicos y Polifenoles

Algunos de los fitoquímicos bioactivos más simples consiste de solo un anillo fenólico sustituido. Los ácidos cinámico y caféico son comúnmente representativos de un amplio grupo de compuestos derivados de fenilpropano los cuales están en un estado de oxidación más alto. Las hierbas de olor tarragón y tomillo contienen ácido caféico el

cual es efectivo contra virus (Wild, 1994), bacterias (Brantner y Grein, 1994) y hongos (Duke, 1985).

Los compuestos fenólicos poseen una cadena lateral C3 a un nivel de oxidación más bajo y no conteniendo oxígeno son clasificados como aceites esenciales y frecuentemente citados como antimicrobianos también. El eugenol es un bien caracterizado representativo encontrado en aceite de clavo. Es considerado por poseer propiedades bacteriostáticas (Thomson, 1978) y anti fúngicas (Duke, 1985).

4.4.6.6. Taninos

Los taninos es un nombre descriptivo general para un grupo de sustancias fenólicas poliméricas capaces de tostar la piel o precipitar gelatina de una solución, una propiedad conocida como astringencia. Los taninos tienen actividad antimicrobiana, y su modo de acción, es descrito por la quinona, y puede ser relacionado a su habilidad para activar adhesiones microbianas, enzimas, envoltura celular, transporte de proteínas, etc. También forman complejos con polisacáridos (Ya *et al.*, 1988). Se encuentran en casi cada parte de la planta: corteza, tallo, hojas, frutas y raíces (Scalbert, 1991).

4.4.6.7. Quinonas

Las quinonas son anillos aromáticos con 2 sustituciones cetona. Son ubicuos en la naturaleza y son característicamente altamente reactivos. El potencial de los efectos

antimicrobianos de las quinonas es grande. Los objetivos probables en la célula bacteriana son adhesinas de superficie expuesta, poli péptidos de pared celular, y enzimas de la membrana. Las quinonas pueden también volver los sustratos no disponibles para el microorganismo (Stern *et al.*, 1996).

4.4.6.8. Cumarinas

Las cumarinas son sustancias fenólicas hechas de anillos de benzeno fusionados y alfa pirona (O’Kennedy y Thornes, 1997). La warfarina es una cumarina particularmente bien conocida que se utiliza tanto como anticoagulante oral y, curiosamente como raticida. Los ácidos hidroxicinámicos relacionados con cumarinas, parecen tener efectos inhibidores sobre las bacterias Gram (+) (Fernandez *et al.*, 1996).

4.5. La proteína verde fluorescente GFP y su aplicación

La proteína verde fluorescente (GFP) es codificada por el gen *gfp* de la medusa, *Aequorea victoria* (Cubitt *et al.*, 1995; Prasher, 1992), requiere solo oxígeno y UV o luz azul para la emisión de fluorescencia verde (Andersen *et al.*, 1998). El gen *gfp* no es naturalmente expresado en microorganismos y, por lo tanto, es un reportero ideal para el marcado de cepas bacterianas (Chalfie *et al.*, 1994; Lorang *et al.*, 2001).

Los plásmidos que contienen los genes que expresan la proteína verde fluorescente (GFP), se han introducido en varios microorganismos para producir una etiqueta trazadora estable y fácilmente identificable, particularmente en estudios de alimentos y ambientales (Aspiras *et al.*, 2000; Errampalli *et al.*, 1999; Franz *et al.*, 2007; Scott *et al.*, 1998). En particular, el uso de GFP en *E. coli* O157:H7 ha sido validada, y ha mostrado no tener algún efecto en las células a las que se ha introducido (Noah *et al.*, 2005; Vialette *et al.*, 2004).

Entre los usos de bacterias que expresan la proteína GFP, se encuentra el actuar como controles en análisis microbiológicos. Actualmente, las cepas sin marcar, son usadas para asegurar que los medios y métodos usados estén funcionando adecuadamente en aislar bacterias objetivo, sin embargo en las pruebas a veces puede ocurrir contaminación cruzada o influencia de la flora nativa de los productos, por lo que la utilización de cepas GFP, permiten el fácil reconocimiento y diferenciación de esta cepa con las nativas (Monday *et al.*, 2003).

Las bacterias modificadas ya han sido empleadas en pruebas en modelos alimentarios. Tal es el estudio que llevó a cabo Cuervo (2007), donde utilizó el extracto acuoso de flor de jamaica contra *S. Agona* (GFP) y *E. coli* O157:H7 (RFP), encontrando que la aplicación de 50 mg/ml después de 2 h, produjo una reducción del crecimiento de 1.1 y 0.6 log respectivamente respecto al control (Cuervo, 2007).

Aunque *E. coli* O157:H7 y *Shigella* están asociadas con enfermedades transmitidas por alimentos, casi no han sido publicados estudios sobre los efectos de extractos de plantas como inhibidores del crecimiento de ellas (Davidson y Naindu, 2000; Ezzeddine *et al.*, 2001). De ahí el presente estudio.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Cepas y Condiciones de Cultivo

En este estudio se utilizaron las cepas: *E. coli* O157:H7 ATCC 43890 GFP enterohemorrágica (VTEC) y *S. sonnei* F2353 GFP ambas proporcionadas por el Dr. Peter Feng (Division of Microbiological Studies, U.S. FDA), las cuales han sido modificadas genéticamente para expresar la proteína verde fluorescente (GFP).

Las cepas fueron mantenidas liofilizadas a -80° C en caldo soya tripticasa (CST) suplementado con 0.6 % (p/v) de extracto de levadura (Bioxon, México) conteniendo glicerol (10%, v/v) (Lee *et al.*, 2010).

Los cultivos de trabajo fueron preparados en 5ml de caldo infusión de cerebro y corazón (ICC, Bioxon, México), donde se inoculó una azada del cultivo liofilizado, y se incubó a 37 °C por 24 h. Posteriormente, se inocularon tubos con agar ICC en pico de flauta y se incubaron a 37°C durante 24 h, y fueron almacenados a 4°C, resembrándolos cada 3 meses.

Para cada ensayo los cultivos se activaron en tubos con 5ml de caldo ICC, tomando una azada del cultivo de reserva e incubando a 37°C por 24 h. Posteriormente se reactivó el cultivo tomando una alícuota (50 µl) y se inoculó en tubos de 5 ml de caldo ICC hasta alcanzar la mitad de la fase logarítmica de la población microbiana ($A = 0.5_{600\text{ nm}}$) utilizando un espectrofotómetro (Sequoia Turner Corp. Modelo 340, la cual corresponde a una concentración de 10^8 UFC/ml (Luciano *et al.*, 2008).

5.2. Plantas en Estudio

5.2.1. Preparación de los Extractos

Se realizaron extractos de 20 plantas (Tabla 1) que fueron colectadas en supermercados locales del área Metropolitana de Monterrey, N. L.

Tabla 1. Plantas utilizadas en este trabajo.

Nombre común	Nombre científico	Parte utilizada
Cebolla	<i>Allium cepa</i>	Bulbo
Cebolla morada	<i>Allium cepa</i>	Bulbo
Cilantro	<i>Coriandrum sativum L</i>	Tallo y hoja
Jamaica	<i>Hibiscus sabdariffa</i>	Flor
Jícama	<i>Pachyrhizus erosus</i>	Cáscara y fruto
Limón	<i>Citrus aurantifolia</i>	Cáscara, pulpa y jugo
Mejorana	<i>Origanum majorana</i>	Hojas
Mostaza	<i>Brassica juncea</i>	Semilla
Naranja valencia	<i>Citrus sinensis</i>	Cáscara y fruto
Orégano	<i>Poliomintha longiflora</i>	Tallo y hoja
Papaya	<i>Corica papaya</i>	Cáscara y fruto
Pimienta gorda	<i>Piper nigrum</i>	Fruto
Pimiento rojo	<i>Capsicum annuum</i>	Fruto
Piña	<i>Anana comosus</i>	Fruto
Rábano	<i>Raphanus sativus var. sativus</i>	Fruto
Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Hojas
Tamarindo	<i>Tamarindus indica</i>	Cáscara y fruto
Té negro	<i>Camellia sinensis sinensis</i>	Hojas
Té verde	<i>Camellia sinensis assamica</i>	Hojas
Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>	Hojas

Para la preparación de los extractos se pesaron 20 g del material vegetal y se mezclaron con 100 ml de etanol al 96% y se trituro en una licuadora doméstica (Osterizer model Classic) por 2 min.

Los extractos fueron macerados por 48 h a temperatura ambiente. Posteriormente se hicieron pasar dos veces por papel filtro (Whatman No. 1) y el fluido se colocó en platos extendidos los cuales fueron dejados a temperatura ambiente hasta sequedad. El extracto fue raspado y resuspendido en etanol al 96% (mínima cantidad para manejar el fluido). Los extractos fueron almacenados en frascos ámbar a 4°C hasta su uso posterior, por un tiempo no mayor a 180 d (Hou *et al.*, 2007). Se realizó un plaqueo de los extractos en agar Muller Hinton, y no se observó crecimiento microbiológico.

5.2.2. Determinación del Rendimiento de los Extractos Obtenidos

Se tomó 1.0 ml de cada extracto y se colocó en un tubo de ensayo llevado previamente a peso constante, el cual se colocó en un horno de secado a 50°C hasta que el extracto se evaporó y llegó a peso contante. El peso seco se definió como aquel resultante de la resta del peso del tubo con el extracto menos el peso del tubo solo. Este ensayo se realizó por triplicado.

5.3. Ensayo Preliminar de la Actividad Antimicrobiana de los Extractos de Plantas

Para determinar si los extractos de plantas poseían algún tipo de efecto contra el crecimiento bacteriano, se utilizó la técnica de difusión en pozo en agar (Figura 1). Para

esto, se aplicaron 100µl de los extractos a probar a orificios (5 mm de diámetro) hechos en agar Muller-Hinton (Bioxon) contenido en placas de Petri previamente inoculada por extensión con 100 µL de *E. coli* O157:H7 GFP (10^8 UFC/ml) o *S. sonnei* GFP (10^8 UFC/ml). Los cultivos se incubaron por 24 h a 37°C, tiempo en que se determinó el tamaño del halo de inhibición del crecimiento alrededor del pozo (Ponce *et al.*, 2008).

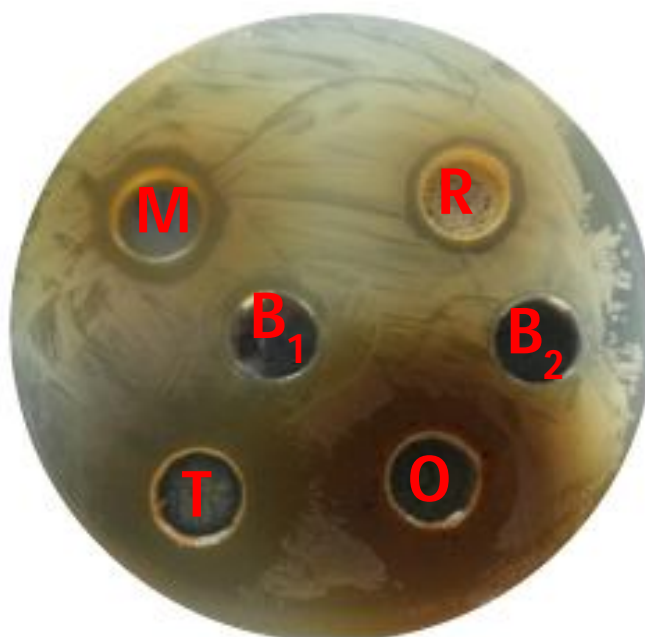


Figura 1. Halos de inhibición de 4 extractos etanólicos y sus respectivos controles sobre el crecimiento de *E. coli* O157:H7. Extracto de mejorana (M), romero (R), tomillo (T), orégano (O), alcohol 96% (B₁), agua estéril (B₂).

5.4. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los Extractos Activos

Se utilizó el método de microdilución descrito por la CLSI (2009). Los extractos a los que se determinó la CMB fueron aquellos que mostraron el mejor resultado en el ensayo preliminar: mejorana, romero, tomillo y orégano.

Se utilizaron placas de microdilución de 96 pozos (Falcon) a cuyos pocillos se agregaron 150 µl de caldo Muller-Hinton y en la primera línea se adicionaron 150 µl del extracto a analizar. Se realizaron diluciones dobles en la hilera de pocillos. Posteriormente se inocularon los pocillos con la cepa a probar (1 % v/v, ajustada a 10^8 UFC/ml) o un coctel de estas.

Para la preparación del coctel bacteriano se colocaron volúmenes iguales (5 ml) de las cepas ATCC 43890, ATCC 43890 GFP, ATCC 43894 y ATCC 43895 de *E. coli* O157:H7 en un matraz estéril o las cepas *S. sonnei* y *S. flexneri* para el coctel de *Shigella* (Juneja y Friedman, 2008).

Los sistemas fueron incubados a 37°C por 24 h. Después de este tiempo, se tomó una alícuota y se sembró en placas con agar Muller-Hinton por el método descrito por Miles y Mishra (1932) y se incubaron a 37°C/24 h. Se observó crecimiento en las placas. La CMB se definió como la mínima concentración del extracto que produjo inhibición total del crecimiento de la cepa analizada (Moreira *et al.*, 2005). Estos experimentos se llevaron a cabo por duplicado.

5.5. Determinación del Efecto Sinérgico Entre los Extractos Activos

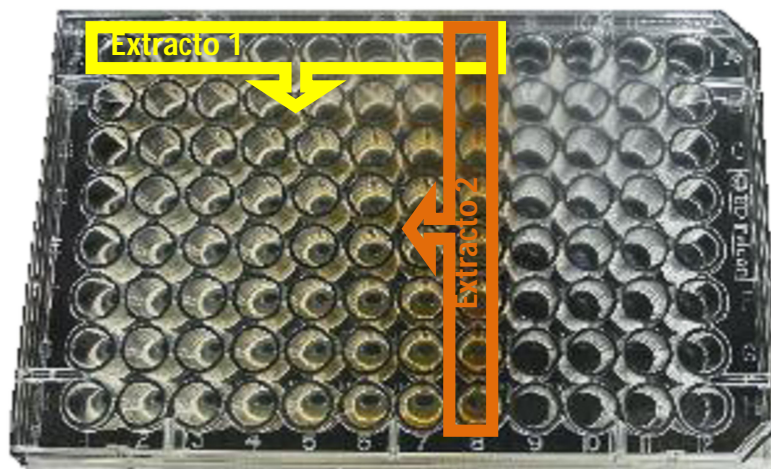


Figura 2. Esquema de la determinación de efectos entre los extractos probados.

Se siguió el método de tablero descrito por Shin y Kang (2003), utilizando microplacas estériles de 96 pocillos (Figura 2).

Se colocaron 300 μ l en la primera fila (serie de pocillos horizontal) de uno de los extractos a una concentración correspondiente a la CMB encontrada previamente. En la primera columna (serie de pocillos vertical) se adicionaron 300 μ l del extracto 2 a la concentración de su CMB encontrada. El resto de los pocillos de la placa fueron llenados con 150 μ l de caldo Muller-Hinton. Se realizaron diluciones dobles a todos los pozos, descartando la última alícuota tanto vertical como horizontalmente.

Por último, se inoculó con el 1% (v/v) de *E. coli* O157:H7 o *S. Sonnei* previamente ajustada a una concentración de 1×10^8 UFC/ml. Todos los pocillos finalmente contienen un volumen de 151.5 μ l.

Posteriormente se determinó el efecto de las combinaciones de los extractos de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$CFB_{\text{índice}} = A + B$$

CFB: índice de concentración fraccional bactericida

donde:

$A = (\text{CMB de la mezcla X + Y}) / \text{CMB del extracto X solo}$

$B = (\text{CMB de la mezcla X + Y}) / \text{CMB del extracto Y solo}$

El criterio para determinar el tipo de interacción fue el siguiente (Kamatou *et al.*, 2006):

Índice CFB < 1, significa sinergismo

Índice CFB entre 1 y 2, indica efecto aditivo o indiferente

Índice CFB > 2, significa un efecto antagónico

5.6. Efecto de Extractos de Plantas y sus Mezclas en un Modelo de Carne de Res

5.6.1. Muestra Utilizada

Las muestras de carne molida de pulpa negra 94/6 (6% de grasa) y pulpa negra en trozo fueron colectadas en un supermercado local y se almacenaron en refrigeración a $4^{\circ}\text{C} \pm 1$ hasta su uso, por un tiempo no mayor a 2 d. Estas muestras fueron utilizadas sin tomar en cuenta su microflora, ya que las cepas que se utilizaron poseían el marcador fluorescente, lo cual permitió trabajar con las muestras sin tratar o descontaminar.

5.6.2. Actividad Antimicrobiana de los Extractos de Plantas Sobre Carne de Res Contaminada Artificialmente

Para este ensayo se probaron los extractos de mejorana, romero, tomillo, orégano (3X CMB) y la mezcla de orégano y tomillo (3X CFB).

Los extractos etanólicos ajustados fueron secados, y resuspendidos en 10 ml de agua hasta ajustarlos a una concentración 3X de la CMB encontrada previamente en cada caso. Estos fueron mezclados con agentes emulsificantes como lecitina de soya (Marca GMC, 100 mg/ml) y monooleato de sorbitán POE (20) (Conarcel TW 80, OXITENO, México 18.6 µl/ml).

Aunque se ha reportado que las dosis infectivas de las cepas probadas suele ser muy baja (< 100 UFC), utilizamos altos niveles de inóculo (10^6 y 10^3 UFC/ml) a fin de poder observar una reducción de la población en nuestros ensayos.

5.6.2.1. Carne Molida de Res

Se siguió la metodología descrita por Karur *et al.*, (2006) con algunas modificaciones. Se utilizó un lote de 630 g de carne molida de res, el cual fue inoculado con 70 ml de la cepa ajustada a $10^8/10^5$ UFC/ml. Se mezcló vigorosamente por cuarteo con las manos utilizando guantes de látex estériles. La muestra fue separada en bolsas que contenía cada una 10 g de la muestra inoculada. A las bolsas se les adicionaron los

extractos solos de las plantas a probar a una concentración 3X de la CMB obtenida previamente o de la CFB de la mezcla. Cada tratamiento se mezcló manualmente y se almacenó a 5°C durante 7 d. Una bolsa fue tomada a los 0, 1, 3, 5 y 7 d y se analizó la presencia de *E. coli* GFP o *S. sonnei* GFP. Como control se utilizó carne molida inoculada sin extracto.

5.6.2.2. Pulpa de Res

Para este ensayo se siguió la metodología descrita por Lin *et al.*, (2004) con algunas modificaciones. Se realizaron cortes a la pulpa con un bisturí estéril, hasta obtener cubos de aproximadamente 5 g, y fueron sumergidos en contenedores con 100 ml de cada extracto que estaba ajustado a una concentración 3X de la CMB previamente encontrada o de la CFB de la mezcla. El sistema se dejó por 10 s a temperatura ambiente, y posteriormente los cubos fueron colocados en papel a fin de remover el exceso de extracto, pasados a platos, en donde se dejaron reposar por 15 min en una campana de flujo laminar para permitir que el extracto se secase sobre la superficie de la carne.

Pasado este tiempo, los cubos fueron sumergidos en 100 ml de una suspensión bacteriana ajustada a $10^8/10^5$ UFC/ml. Finalmente fueron pasados a bolsas estériles y almacenadas a 4°C. Se continuó el análisis tal como está especificado en el punto anterior.

5.6.3. Búsqueda de *E. coli* o *S. sonnei* GFP

Todos los tratamientos fueron analizados a los 0, 1, 3, 5 y 7 d de incubación a 4°C. Esto se realizó adicionando 90 o 45 ml de agua peptonada (0.1% p/v) a la bolsa que contenía 10 g de carne molida de res o 5 g de pulpa respectivamente. Se realizó una agitación vigorosa manualmente durante 15 s. A partir de la muestra se realizaron diluciones decimales con solución salina al 0.85% (p/v). Se tomaron 25 µl de las muestras y fueron sembradas por el método de Miles y Mishra (1932) en placas Petri con agar Muller-Hinton, para posteriormente ser incubadas a 37°C durante 24 h. Para enumerar las poblaciones de *E. coli* y *S. sonnei* GFP se utilizó una lámpara de luz ultravioleta y se realizó el conteo de colonias que presentaron fluorescencia.

5.7. Análisis Estadísticos

Para los análisis preliminares y la determinación de la CMB se establecieron las medias y la desviaciones estándar (SD). Los resultados obtenidos del análisis de las mezclas de extractos fueron graficados en isobolografías por el paquete computacional SIGMAPLOT (versión 11). Los resultados del efecto antimicrobianos de los extractos de plantas en el modelo alimentario fueron convertidos a logaritmo base 10, y se examinaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores (para extractos y cepas) mediante el paquete computacional PASW Statistics (versión 18) y se realizaron pruebas de comparación múltiple de medias por el método de Dunnett. Se analizó una probabilidad del 95% en todos los casos.

6. RESULTADOS

6.1. Ensayos Preliminares de la Actividad Antimicrobiana de los Extractos de Plantas

Se analizaron 20 extractos etanólicos, de los cuales 13 presentaron actividad contra los microorganismos en estudio (Tabla 2). De ellos, se seleccionaron los extractos de mejorana, romero, tomillo y orégano para ensayos posteriores ya que los halos de inhibición fueron mayores a 1 cm de diámetro.

Tabla 2. Inhibición (en cm) de extractos de plantas contra el crecimiento de *E. coli* O157:H7 y *S. sonnei*.

Planta	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Shigella sonnei</i>
	M \pm SD*	M \pm SD
Cebolla	-	-
Cebolla Morada	1.45 \pm 0.10	1.45 \pm 0.06
Cilantro	1.13 \pm 0.05	1.20 \pm 0.08
Jamaica	1.50 \pm 0.14	1.48 \pm 0.05
Jícama	-	-
Limón	2.30 \pm 0.23	2.38 \pm 0.13
Mejorana	1.37 \pm 0.06	1.57 \pm 0.06
Mostaza	-	-
Naranja valencia	-	-

Orégano	1.48 ± 0.10	1.47 ± 0.12
Papaya	-	-
Pimienta gorda	-	-
Pimiento	1.63 ± 0.15	1.63 ± 0.05
Piña	-	-
Rábano	1.05 ± 0.06	1.15 ± 0.06
Romero	1.17 ± 0.10	1.17 ± 0.06
Tamarindo	2.03 ± 0.21	1.83 ± 0.05
Té negro	1.00 ± 0.00	1.40 ± 0.14
Té verde	1.20 ± 0.14	1.40 ± 0.14
Tomillo	1.65 ± 0.07	1.40 ± 0.08
Citrol-K-Ultra (control)	2.50 ± 0.42	2.80 ± 0.28
*M \pm SD: Media \pm Desviación estándar		

6.2. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)

Las CMB obtenidas variaron entre 1.0 y 6.33 mg/ml dependiendo del extracto analizado. La CMB de los extractos de romero, tomillo y orégano fueron muy semejantes entre las cepas estudiadas, siendo de 5.33, 1.0 y 2.5 mg/ml respectivamente. Se observaron diferencias con el extracto de mejorana que para *E. coli* O157:H7 fue de 6.33mg/ml y para *S. sonnei* de 3.33 mg/ml.

Respecto a las CMB de los cocteles compuestos de 4 cepas de *E. coli* O157:H7 (ATCC 43890, ATCC 43890 GFP, ATCC 43894 y ATCC 43895), y 2 cepas de *Shigella* (*S. sonnei* y *S. flexneri*), se encontró que las CMB para *E. coli*, en general resultaron más altas que las obtenidas previamente para las cepas GFP (Tabla 3). Por el contrario, cuando analizamos el coctel de *Shigella* los resultados de la CMB fueron menores a los obtenidos por *S. sonnei* GFP (Tabla 3).

Tabla 3.Concentraciones mínimas bactericidas (CMB en mg/ml) de extractos de plantas contra el crecimiento de *E. coli* O157:H7 y *S. sonnei*.

Planta	Coctel <i>E. coli</i> O157:H7(ATCC 43890, 43890 GFP, 43894 y 43895)				Coctel <i>Shigella</i> (<i>S. sonnei</i> y <i>S.</i> <i>flexneri</i>)
	<i>E. coli</i> O157:H7		<i>S. sonnei</i>		
Mejorana	6.33 ± 0.58	8.00	3.33 ± 0.58		2.00
Romero	5.33 ± 0.58	7.00	5.33 ± 0.58		5.00
Tomillo	1.00 ± 0.00	3.00	1.00 ± 0.00		1.00
Orégano	2.5 ± 0.58	2.00	2.33 ± 0.58		2.00

Citrol-K-Ultra	0.20 ± 0.00	0.20	0.20 ± 0.00	0.20
Media ± desviación estándar (en mg/ml)				

6.3. Determinación del Efecto Sinérgico de los Extractos de Plantas Probados Contra el Crecimiento de *E. coli* O157:H7 y *S. sonnei*

Cuando analizamos mezclas de extractos de plantas, encontramos que las dos cepas probadas mostraron CMB más bajos que los obtenidos en forma individual (Tabla 4). Cuando se calcularon las concentraciones fraccionales bactericidas (CFB _{índice}) estas oscilaron entre 0.51 a 1 (Tabla 4). Encontramos indiferencia (CFB =1) entre los extractos de mejorana-tomillo, mejorana-orégano y romero-tomillo con la cepa de *S. sonnei*. El resto de las combinaciones revelaron sinergismo (CFB ≤ 0.75) (Pei *et al.*, 2009). En el caso de la cepa de *E. coli* O157:H7 en general se obtuvieron CFBs entre 0.53 a 0.75 indicando sinergismo, con la excepción de la combinación entre mejorana y tomillo, que mostró efecto antagónico (CFB ≥ 2). En la figura 3 se representan gráficamente las combinaciones de extractos para ambos microorganismos.

Tabla 4. Efecto de tratamientos con extractos combinados en el crecimiento de *E. coli* O157:H7 y *Shigella sonnei* de acuerdo al CFB _{índice}.

Cepa	Componentes		CMB (mg/ml)		CFB (mg/ml)		CFB _{índice}
	A	B	A	B	A	B	
<i>E. coli</i> O157:H7	Mejorana	Romero	6.33	5.33	3.00	0.63	0.63
<i>E. coli</i> O157:H7	Mejorana	Tomillo	6.33	1.00	≥6.33	≥1.00	≥2.00
<i>E. coli</i> O157:H7	Mejorana	Orégano	6.33	2.50	0.10	1.00	0.75
<i>E. coli</i> O157:H7	Romero	Tomillo	5.33	1.00	2.50	0.13	0.63
<i>E. coli</i> O157:H7	Romero	Orégano	5.33	2.50	0.63	1.00	0.63
<i>E. coli</i> O157:H7	Tomillo	Orégano	1.00	2.50	0.50	0.06	0.53

<i>S. sonnei</i>	Mejorana	Romero	3.33	5.33	0.05	2.50	0.52
<i>S. sonnei</i>	Mejorana	Tomillo	3.33	1.00	1.50	0.50	1.00
<i>S. sonnei</i>	Mejorana	Orégano	3.33	2.50	1.50	1.00	1.00
<i>S. sonnei</i>	Romero	Tomillo	5.33	1.00	2.50	0.50	1.00
<i>S. sonnei</i>	Romero	Orégano	5.33	2.50	2.50	0.13	0.56
<i>S. sonnei</i>	Tomillo	Orégano	1.00	2.50	0.50	0.02	0.51

De acuerdo a estos resultados, se seleccionó la mezcla tomillo-orégano (CFB ^{Índice} 0.53 y 0.51) para ambos microorganismos, misma que se procedió a aplicar en el modelo alimentario, ya que fue la que mostró un mejor efecto sinérgico.

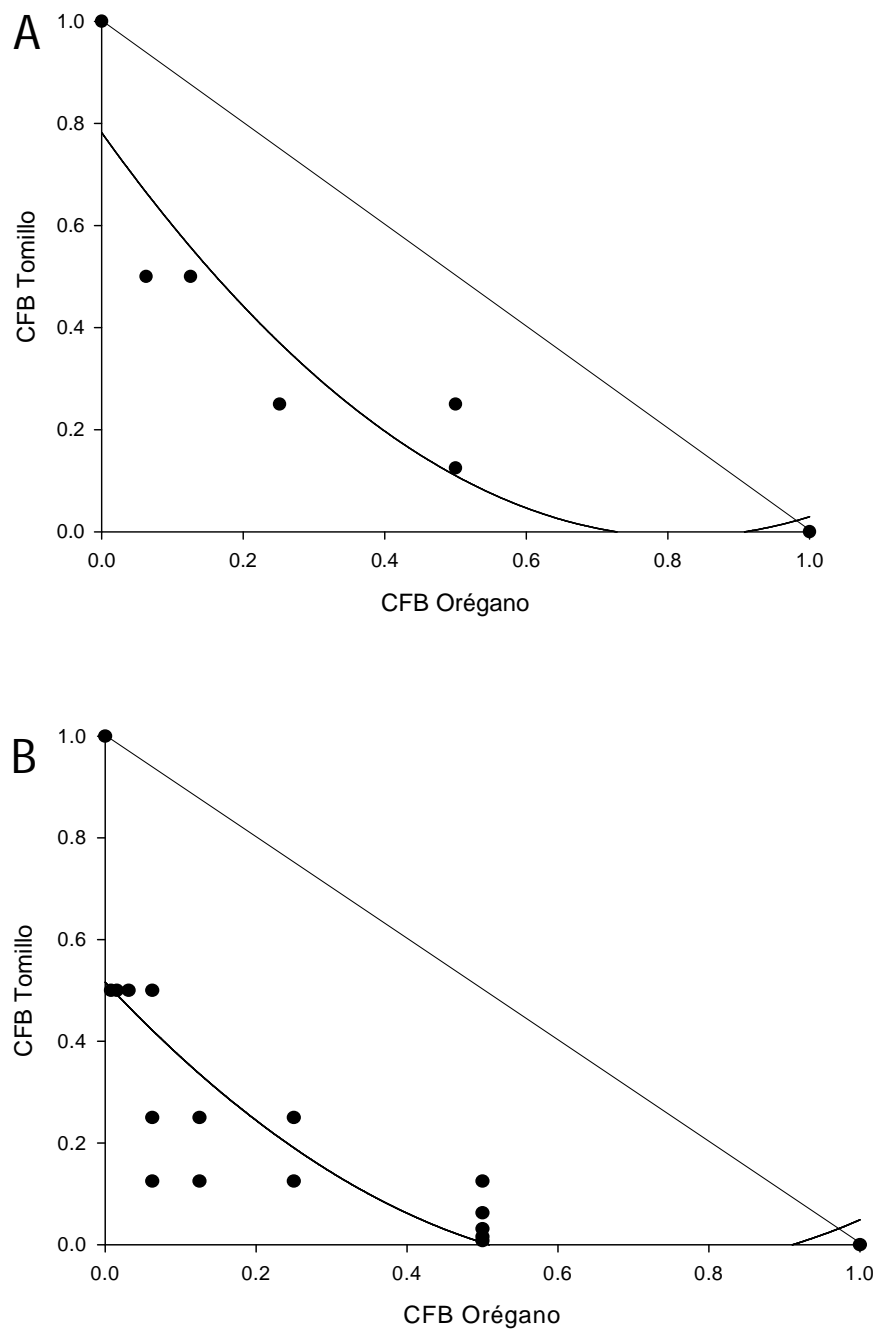


Figura 3. Isoblograma de concentración fraccional bactericida (CFB) para la combinación de tomillo (*Tymus mastichina*) y orégano (*Lippia graveolens*) para eliminar *E. coli* O157:H7 (A) y *S. sonnei* (B) en caldo Muller-Hinton.

6.4. Actividad Antimicrobiana de los Extractos de Plantas Sobre Carne de Res Contaminada

Cuando el nivel de inóculo fue de 10^6 UFC/ml, para el caso de *S. sonnei* encontramos que a 3 d de almacenamiento a 4°C, los tratamientos a los que se les agregaron extractos de plantas (solos o en combinación) no presentaron diferencia significativa, al compararlo con el control, lográndose una reducción de 0.4 log para ambos modelos alimentarios (Figura 6 y 7).

Cuando analizamos el efecto de los extractos sobre el crecimiento de *E. coli* O157:H7 la mezcla utilizada resultó ser aparentemente más efectiva que los demás tratamientos (Figura 4 y 5), sin embargo el análisis estadístico no mostró diferencias con el control, encontrando al igual que en el caso anterior, una reducción del crecimiento de 0.4 log.

Cuando el inóculo fue de 10^3 UFC/ml en los modelos alimentarios, no observamos reducción de ninguno de los microorganismos probados (Figura 4-7), incluso pudimos observar que los tratamientos con extractos presentaban cuentas mayores que los controles.

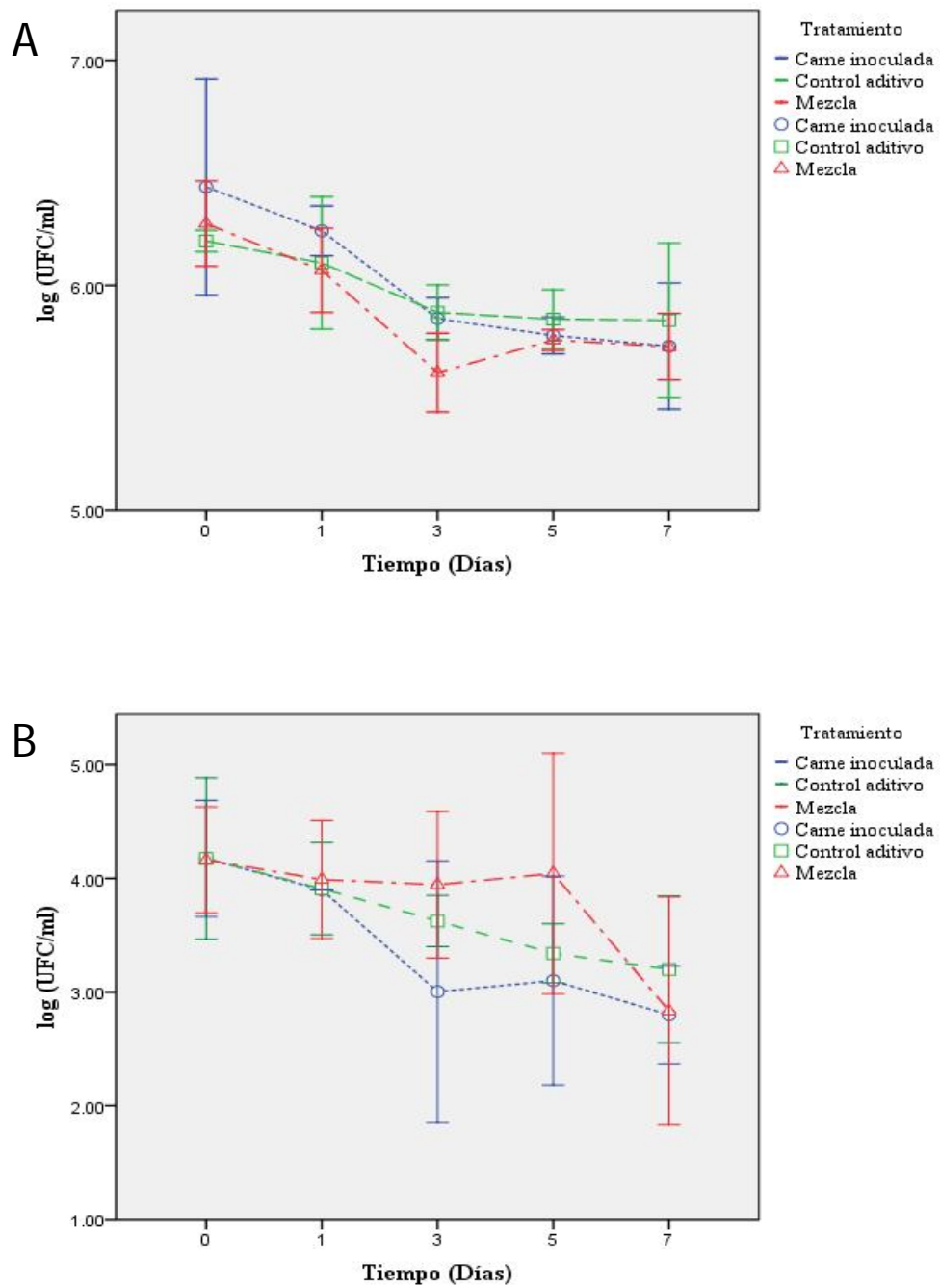


Figura 4. Viabilidad de *E. coli* O157:H7 por mezcla de extracto de tomillo (*Tymus mastichina*) y orégano (*Lippia graveolens*) en un modelo de carne molida de res al aplicar 10^6 UFC/g (A) o 10^3 UFC/g (B)

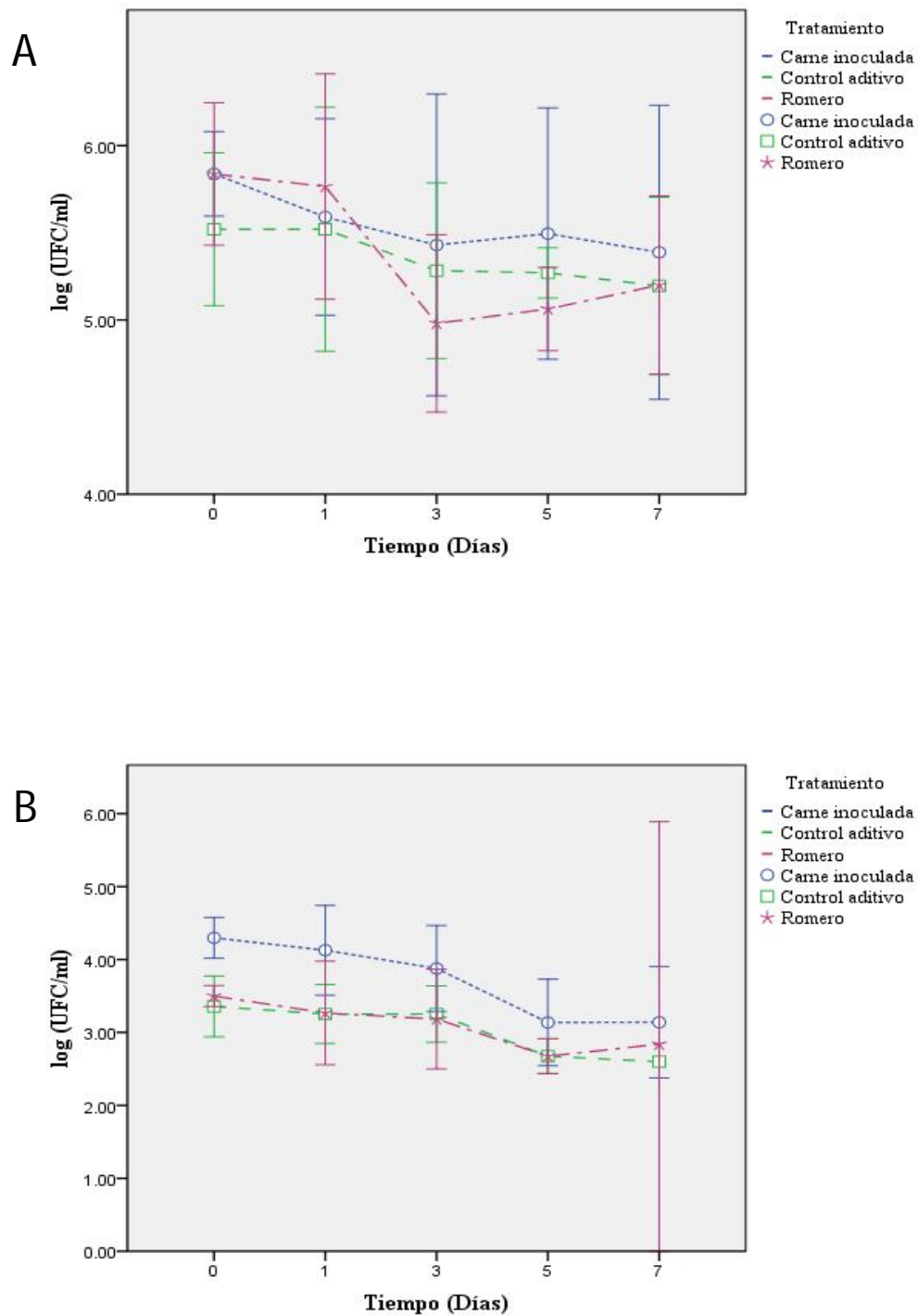


Figura 5. Viabilidad de *E. coli* O157:H7 por extracto de romero (*Rosmarinus officinalis*) en un modelo de pulpa magra de res al aplicar 10^6 UFC/g (A) o 10^3 UFC/g (B)

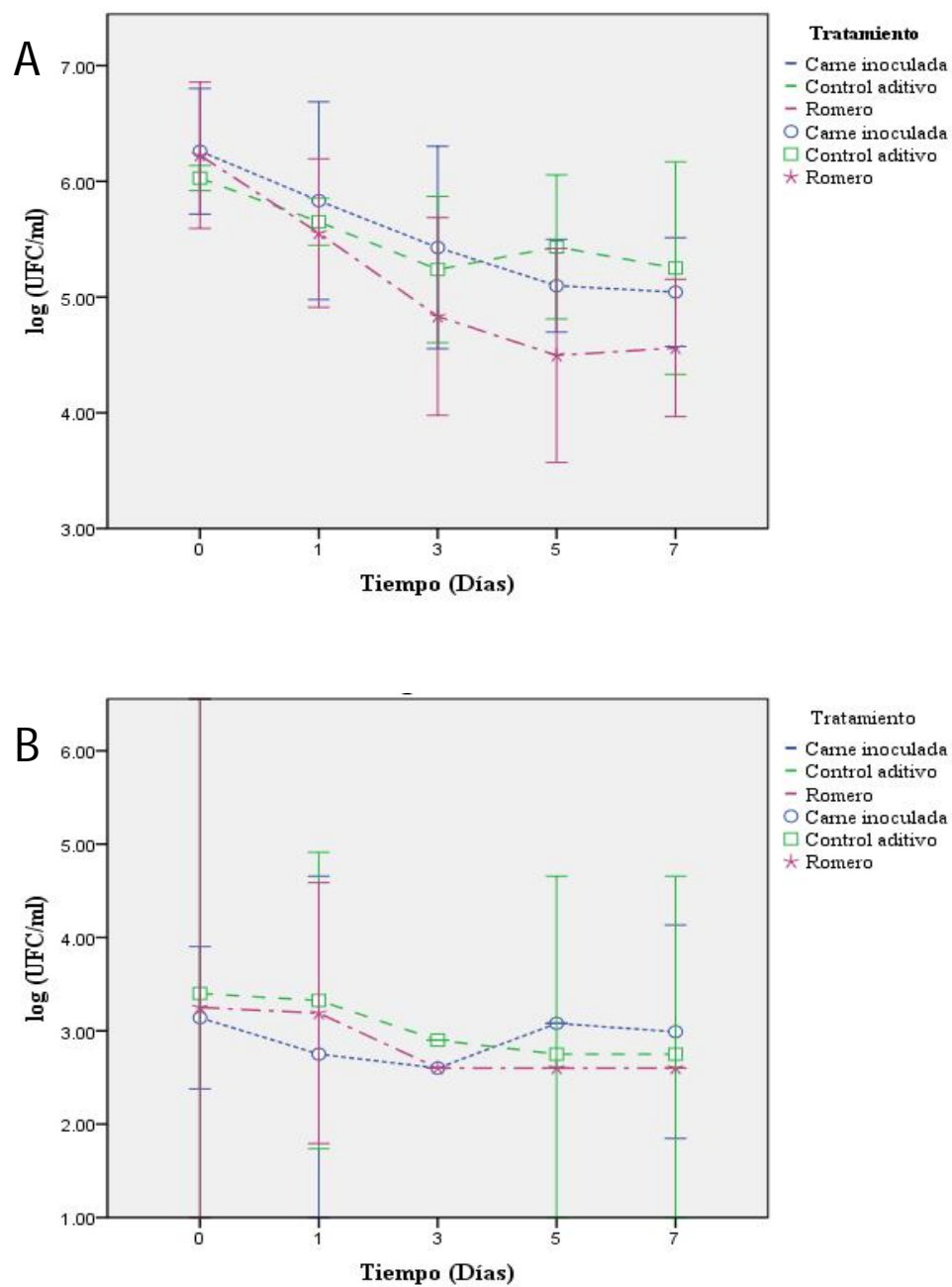


Figura 6. Viabilidad de *Shigella sonnei* por extracto de romero (*Rosmarinus officinalis*) en un modelo de carne molida de res al aplicar 10^6 UFC/g (A) o 10^3 UFC/g (B)

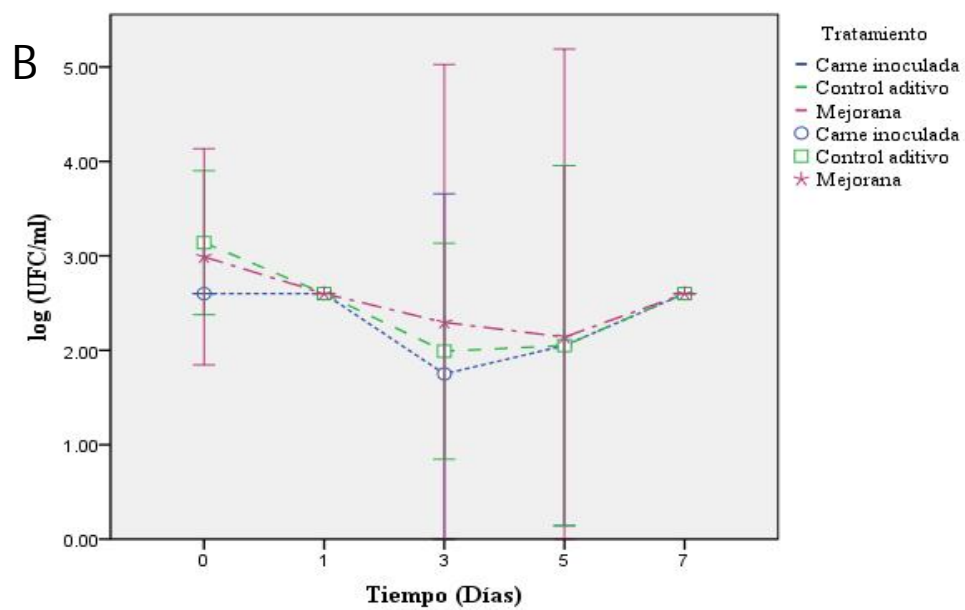
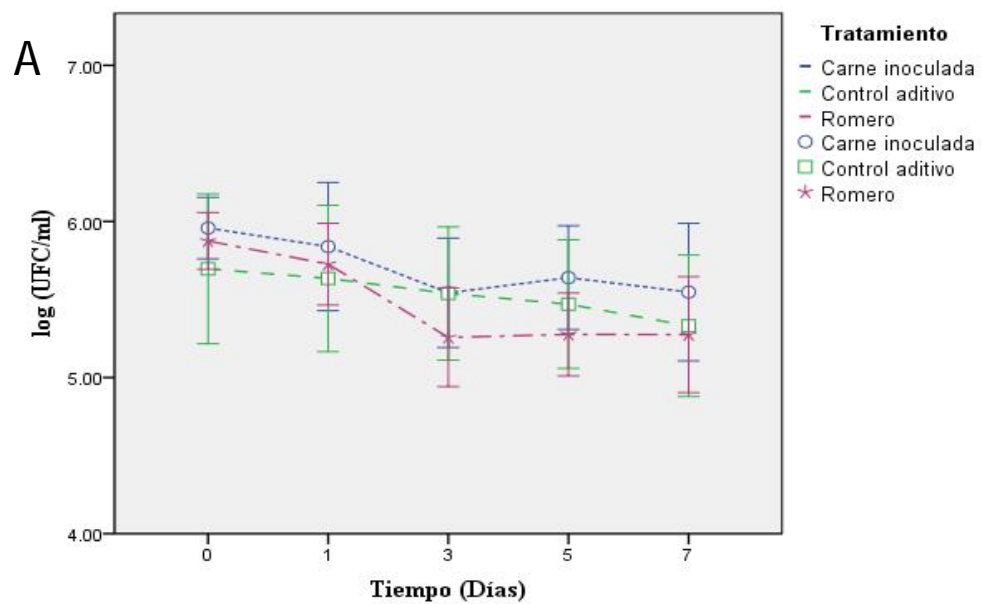


Figura 7. Viabilidad de *Shigella sonnei* por extracto de romero (*Rosmarinus officinalis*) en un modelo de pulpa magra de res al aplicar 10^6 UFC/g (A) o 10^3 UFC/g (B)

7. DISCUSIÓN

Desde la antigüedad se han utilizado plantas medicinales para remedios caseros y las especies se han utilizado como conservadores de alimentos (Arcaraz *et al.*, 2000). Algunos compuestos presentes en las plantas tienen efectos bactericidas o bacteriostáticos (Cowan, 1999).

En el presente estudio, se examinó la actividad antimicrobiana de 20 extractos etanólicos de plantas. Los resultados obtenidos por el método de difusión en agar es adecuada para evaluar de manera rápida la actividad de extractos de plantas (Fisher y Philips, 2006). Sin embargo, debe considerarse la solubilidad de los compuestos presentes en los extractos, puesto que la presencia de halos pequeños o grandes, se puede deber a esto mismo (Hammer *et al.*, 2003).

Los mecanismos por los cuales los extractos de plantas tienen efecto antibacteriano no están completamente entendidos, sin embargo existen varios mecanismos propuestos

(Holley y Patel, 2005). Se ha establecido que la membrana externa puede ser un blanco común de estos compuestos, en el caso de *E. coli* y *S. Typhimurium* se ha observado desintegración seguida de la exposición a carvacrol y timol (Helander *et al.*, 1998). También se ha reportado rompimiento de la pared celular, junto con el incremento de aspereza de la misma, y pérdida de componentes citoplásmicos en *L. monocytogenes* tratados con aceite esencial de tomillo (Rasooli *et al.*, 2006).

Se ha reportado que las bacterias Gram (+) son más sensibles a extractos de plantas que las bacterias Gram (-), lo cual puede ser debido a la membrana externa que es relativamente impermeable y que envuelve las bacterias Gram (-) (Smith-Palmer *et al.*, 1998). En este estudio el extracto de orégano y tomillo mostraron un efecto bactericida a una concentración de 2.33-2.50 y 1.0 mg/ml para los microorganismos probados (Gram (-)). Gutiérrez *et al.*, (2009) encontraron CMI's para la bacteria Gram (-) *P. fluorescens* de 1.25, 1.50, 75.0 y 37.50 mg/ml y para la bacteria Gram (+) *L. monocytogenes* de 0.10, 0.125, 1.25 y 5.0 mg/ml al ser probadas con aceites esenciales de orégano, tomillo, bálsamo de limón y mejorana respectivamente.

En este trabajo encontramos que los extractos que mostraron mayores halos de inhibición fueron el de limón y el Citrol-K Ultra (extracto comercial), esto concuerda con lo que mencionaron Tamblyn y Conner (1997) y Burt (2004), de que los extractos de cítricos son usualmente muy efectivos contra crecimiento bacteriano. En este estudio, prácticamente todas las especies analizadas (tomillo, orégano, romero y mejorana)

mostraron buena actividad inhibitoria del crecimiento contra los dos microorganismos patógenos analizados.

La actividad antimicrobiana en tomillo puede ser atribuida al timol que ha reportado como un constituyente importante. Pei *et al.*, (2009) encontraron que el timol, mostró un fuerte efecto inhibitorio contra *E. coli*.

En el caso de los extractos de mejorana, romero, y orégano mostraron una buena actividad contra el crecimiento de *E. coli* O157:H7 y *S. sonnei*. Esta actividad puede ser atribuida a algunos compuestos presentes en ellos como el linalool (Charai *et al.*, 1996), el ftalazina (Bayoub *et al.*, 2010) y el carvacrol (Valero y Giner, 2006) respectivamente.

Los extractos que se utilizaron en esta investigación fueron etanólicos. El extracto de tomillo exhibió un CMB de 1.0 mg/ml para todas las cepas analizadas, en tanto que para el orégano varió entre 2.5 y 2.33mg/ml. Se ha reportado que la CMB de los aceites esenciales de timol y carvacrol, principales componentes del tomillo y orégano respectivamente, se ubica alrededor de 0.8 mg/ml para *E. coli* (Pei *et al.*, 2009). Esto es razonable cuando vemos que algunos estudios han concluido que los aceites esenciales tienen una mayor actividad antibacteriana que los mejores componentes mezclados (Gill *et al.*, 2002; Mourey y Canillac, 2002). Burt (2004) sugirió que los componentes menores presentes en los extractos son más importantes para potenciar la actividad que

los componentes principales de aceites esenciales mezclados, y pueden tener efectos sinérgicos o una influencia potenciada. Como muchos aceites esenciales de plantas poseen compuestos con estructuras similares, sus combinaciones pueden exhibir más bien efectos aditivos que sinérgicos (Dorman y Deans, 2000). Además, como la eficacia de aceites esenciales también depende de propiedades lipofílicas, fuerza de grupos funcionales o su solubilidad acuosa (Dorman y Deans, 2000), la mezcla de compuestos en los aceites esenciales pueden contribuir a ese efecto “aditivo”.

Se ha reportado que la extracción de los compuestos activos de plantas está en función al solvente usado en el procedimiento de extracción (Parekh *et al.*, 2005; Majhenic *et al.*, 2007), en donde los extractos etanólicos se reportan como aquellos que extraen una mayor cantidad de compuestos con actividad antimicrobiana en comparación con los compuestos extraídos por solventes acuosos. Stefanovic *et al.*, (2009), encontraron que el extracto acuoso de culantrillo poseía una concentración mínima inhibitoria (CMI) del crecimiento de *B. subtilis* y *P. fluorescens* (entre otras) de alrededor de 20 mg/ml, sin embargo, cuando el solvente utilizado fue etanol, la CMI se redujo a 5 mg/ml. Esta mayor actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos puede ser debida a una mejor solubilidad de compuestos activos orgánicos como polifenoles y flavonas que han mostrado tener actividad antimicrobiana (Cowan, 1999).

Aunque algunos extractos de plantas han mostrado tener una buena actividad antimicrobiana, algunos reportes han señalado la potenciación de este efecto debido a un

efecto sinérgico entre varios extractos (Caccioni *et al.*, 1998; Burt 2004). En este trabajo, buscamos la existencia de efecto sinérgico entre los extractos. Encontramos que 5 combinaciones (mejorana/romero, mejorana/orégano, romero/tomillo, romero/orégano, tomillo/orégano a una concentración de 1X CFB) tuvieron efecto sinérgico contra el crecimiento de *E. coli* O157:H7 y 3 de ellas (mejorana/romero, romero/orégano, y tomillo/orégano 1X CFB) contra *S. sonnei*.

Gutierrez *et al.*, (2008) ya había reportado los efectos sinérgicos de las combinaciones de orégano + albahaca, orégano + bálsamo de limón, orégano + mejorana, orégano + romero, orégano + salvia y orégano + tomillo, obteniendo FICs de 0.83, 0.86, 0.75, 0.79, 1.00 y 0.78 para *B. cereus*, 1.00, 1.17, 0.83, 1.83, 1.38 y 1.17 para *E. coli*, 1.25, 1.25, 1.18, 1.50, 1.75 y 1.18 para *L. monocytogenes*; y 1.00, 1.38, 1.75, 1.50, 1.50 y 0.88 para *P. aeruginosa*. Reduciéndose a la mitad y hasta un cuarto de la CMB en alguno de sus 2 componentes binarios.

Del mismo modo Gutiérrez *et al.*, (2009) también reportaron el efecto sinérgico para las combinaciones de orégano + mejorana, orégano + bálsamo de limón, orégano + tomillo, tomillo + mejorana, y tomillo + bálsamo de limón, encontrando FICs de 2.00, ND, 0.88, 1.38 y ND para *P. fluorescens*, ND, 1.50, 1.00, ND y 0.75 para *L. innocua*; y ND, 1.25, 1.18, ND y 1.25 para *L. monocytogenes*, en donde se encontraron reducciones semejantes del crecimiento que los mostrados por los aceites esenciales probados.

Stefanovic *et al.*, (2009) encontraron un efecto sinérgico de plantas al mezclar extracto etanólico de *T. anthriscus* (culantrillo) con estreptomicina y cloranfenicol. Contra el crecimiento de bacterias patógenas La presencia de efectos sinérgicos representa grandes ventajas, ya que muchas veces las concentraciones necesarias de los extractos para inhibir a microorganismos es menor, que cuando están individuales, lo cual puede reducir aromas y sabores que afectan las propiedades sensoriales del producto. Sin embargo, también se ha encontrado que la combinación de dos agentes provocan sinergismo significativo cuando el microorganismo que se quiere atacar posee una CMI alta por lo menos a uno de los agentes (Esimone *et al.*, 2006).

Stanojević, (2010) estudió los efectos sinérgicos entre el extracto acuoso de salvia y algunos conservadores artificiales. Los mejores resultados fueron los encontrados para la combinación de salvia + benzoato de sodio para *E. coli*, *P. fluorescens* y *S. aureus* entre otras, con FICs de 1.50, 1,25 y 0.75 respectivamente, reduciendo las CMBs individuales a un cuarto para el extracto y a un octavo para el conservador.

Algo que encontramos en este trabajo fue que los extractos analizados fueron más efectivos *in vitro* que cuando fueron aplicados al modelo alimentario. Otros autores ya habían previamente observado este aspecto estableciendo que se necesitan concentraciones más altas de extractos de plantas para ser efectivos cuando son usados en alimentos comparados con estudios *in vitro* en donde incluso en ocasiones se requiere

incrementar 10 veces la concentración del agente para ser efectivo en salchichas de puerco, y entre 25 a 100 veces más cuando fue utilizado en queso blando (Tassou y Nychas, 1996).

Se ha especulado que esta alta concentración de los extractos en el modelo alimentario se debe a que en el alimento existe una mayor disponibilidad de nutrientes, lo cual puede habilitar a las células bacterianas a repararse más eficientemente. También ha visto que se requieren concentraciones menores de los extractos cuando se aplican en ensaladas y vegetales que las requeridas en productos con alto contenido de lípidos. Se piensa que los lípidos ayudan a la reparación del daño a la célula, ya que algunos bactericidas como los aceites esenciales actúan sobre los lípidos de la pared celular (Smit-Palmer *et al.*, 1998). Es decir, a mayor cantidad de lípidos en el alimento, mayor cantidad de bactericidas naturales requeridos para ejercer el mismo efecto, pues la cantidad extra de lípidos en el seno del alimento ayuda a reparar la parte de pared celular que fue atacada (Smit-Palmer *et al.*, 1998).

Dada la actual tendencia y preferencia del consumidor por alternativas más naturales como bactericidas en vez de utilización de sustancias químicas (Brul y Coote, 1999), los extractos de plantas pueden convertirse en una alternativa viable para la industria.

Aunque muchos componentes de los extractos de plantas son definidos como seguros (GRAS, por sus siglas en inglés), pueden alterar las propiedades sensoriales del alimento que los contienen e impiden su utilización masiva. Esto se observó al tratar de controlar a *B. cereus* en caldo zanahoria, al cual se le agregó carvacrol, cinamaldehído y timol, que aunque provocó una inhibición satisfactoria de la bacteria, no fue aceptable por un panel de degustadores (Valero y Ginger, 2006).

Para tratar de minimizar estos efectos, la industria está viendo como alternativa la aplicación de “tecnologías de barrera” a fin de disminuir los niveles de extractos de plantas y combinarlos con otras técnicas de conservación tales como refrigeración y/o atmósferas modificadas. Se ha establecido que bajas temperaturas en combinación con adición de 2 µl de cinamaldehído fue efectiva para el control de *B. cereus* en caldo de zanahoria, sin modificar las propiedades sensoriales a una temperatura de 8°C (Valero y Frances, 2006), así como la combinación de bajas temperaturas (5°C), atmósferas modificadas (40% CO₂ /30% O₂ /30% N₂) y aceite esencial de orégano (8 mg/g) fue efectivo contra *S. Typhimurium* en filetes de carne de res contaminados experimentalmente (Skandamis *et al.*, 2002).

Estudios semejantes realizados por Gadang *et al.*, (2008) no encontraron reducción significativa de *L. monocytogenes* cuando agregaron extracto de semillas de uva a recubrimientos comestibles de proteína de suero y embutir salchichas fermentadas (Baydar *et al.*, 2004). En otro estudio, al agregar extracto de uva se provocaba inhibición del crecimiento de *E. coli* O157:H7 *in vitro*. Sin embargo, cuando se probaron esas

concentraciones en carne molida de res, la reducción que se obtuvo fue de solo 1 log (Ahn *et al.*, 2004).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se rechaza la hipótesis.

8. CONCLUSIONES

1. Los extractos etanólicos de mejorana, romero, tomillo y orégano inhibieron el crecimiento de *E.coli*O157:H7 y *S. sonnei*.
2. Las CMB encontradas para mejorana, romero, tomillo y orégano fueron para *E. coli* O157:H7: 6.33, 5.33, 1.00 y 2.50 mg/ml; y para *Shigella sonnei*: 3.33, 5.33, 1.00 y 2.33 mg/ml respectivamente.
3. Las mezclas de mejorana/romero, romero/orégano y tomillo/orégano presentaron un efecto sinérgico contra el crecimiento de ambos: *E. coli* O157:H7 y *S. sonnei*. En tanto que mejorana/orégano y romero/tomillo solo presentaron sinergismo para *E. coli* O157:H7.

4. Cuando se probaron los extractos (a la concentración 3X CMB) y la mezcla de tomillo/orégano (3X CFB), no se observó disminución de la población de *E. coli* o *S. sonnei* en carne molida y pulpa de res.

LITERATURA CITADA

Abumuhor I, Kearns EH. 2002. Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. The Virtual Health Care Team, School of Health Professions and the School of Medicine, University of Missouri, Columbia.[Internet]. Disponible en: www.vhct.org/case2300/morbidity.shtml [Revisado el 01 de febrero de 2010].

Acuña AM, Alfonso A, Algorta G, Anchieri D, Betancor L, Chabalgoity A, Chiparelli H, Da Silva A, Deambrosio N, Ferrari AM, Gadea P, Gularte E, Legani M, Lindner C, Macedo M, Martinez A, Mateos S, Mattera A, Medina D, Montano A, Odizzio M, Pérez MC, Repiso MV, Rodriguez G, Salvatella R, Savid M, Schelotto F, Torres ME, Varela G, Vicentino W. 2002. Enfermedades transmitidas por alimentos en Uruguay, Montevideo: OPS, Uruguay, Montevideo pp. 214.

Adame J, Adame H. 2000. Plantas curativas del noreste mexicano. Castillo: México, D.F.

Ahn J, Grun IU, Mustapha A. 2004. Antimicrobial and antioxidant activities of natural extracts *in vitro* and in ground beef. J. Food Prot. 67:148–155.

Akinyemi KO, Oluwa OK, Omomigbehin EO. 2006. Antimicrobial activity of crude extracts of three medicinal plants used in south-west nigerian folk medicine on some food borne bacterial pathogens. Afr. J. Trad. CAM. 3:13 – 22.

Al-Tarawneh AA. 2004. Study on *Pseudomonas aeruginosa* isolated from infected patients: copper uptake, hematological findings and effect of some medicinal plants. Thesis (Master in Science). Sudan University for Science and Technology.

Alves TM, Silva AF, Brandao M, Grandi TS, Samania EF, Junior AS, Zani CL. 2000. Biological screening of Brazilian medicinal plants. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 95:367-373.

Amaral JA, Ekins A, Richards SR, Knowles R. 1998. Effect of selected monoterpenes on methane oxidation, denitrification, and aerobic metabolism by bacteria in pure culture. Appl. Environ. Microbiol. 64:520-525.

Andersen JB, Sternberg C, Poulsen LK, Bjorn SP, Molin S. 1998. New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 64:2240–2246.

Arcaraz LE, Blanco SE, Puig ON, Tomas F, Ferretti FH. 2000. Antibacterial activity of flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. J. Theor. Biol. 205:231–240.

Aridogan BC, Baydar H, Kaya S. 2002. Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. Arch. Pharm. Res. 25:860-864.

Aspiras MB, Kazmerzak KM, Kolenbrander PE, McNab R, Hardegen N, Jenkinson HF. 2000. Expression of green fluorescent protein in *Streptococcus gordonii* DL1 and its use as a species-specific marker in coadhesion with *Streptococcus oralis* 34 in saliva-conditioned biofilms in vitro. Appl. Environ. Microbiol. 66:4074–4083.

Aureli P, Costantini A, Zolea S. 1992. Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 55:344-348.

Ayafor JF, Tchuendem MHK, Nyasse B. 1994. Novel bioactive diterpenoids from *Aframomum aulacocarpos*. J. Nat. Prod. 57:917-923.

Bajpai V, Dung NT, Kwon OJ, Kang SC. 2008. Analysis and the potential applications of essential oil and leaf extracts of *Silene armeria* L. to control food spoilage and food-borne pathogens. Eur. Food Res. Technol. 227:1613–1620.

Balandrin MF, Klocke JA, Wurtele ES, Bollinger WH. 1985. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science*. 228:1154-1160

Banias C, Oreopoulou V, Thomopoulos CD. 1992. The effect of primary antioxidants and synergists on the activity of plant extracts in lard. *J. American Oil Chem. Soc.* 69:520–524.

Baydar NG, Sagdic O, Ozkan G, Cetin S. 2004. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Control*. 15:335–339.

Bayoub K, Baibai T, Mountassif D, Retmane A, Soukri A. 2010. Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against *Listeria monocytogenes* and some other pathogenic strains. *African J. Biotech.* 9:4251-4258.

Bettelheim KA. 2003. Non O157 Verotoxin-producing *Escherichia coli* .A problem, paradox and paradigm. *Exp. Biol. Med.* 228:333–344.

Blanco M, Padola NL, Kruger A, Sanz ME, Blanco JE, Gonzalez EA, Dahbi G, Mora A, Bernardez MI, Etcheverria AI, Arroyo GH, Lucchesi PM, Parma AE, Blanco J. 2004. Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. *Int. Microbiol.* 7:269-276.

Bounatirou S, Smiti S, Miguel MG, Faleiro L, Rejeb MN, Neffati M, Costa MM, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG. 2007. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. *Food Chem.* 105:146-155.

Brantner A, Grein E. 1994. Antibacterial activity of plant extracts used externally in traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.* 44:35-40.

Brul S, Coote P. 1999. Mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int. J. Food Microbiol.* 50:1–17.

Burt SA. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. *Int. J. Food Microbiol.* 94:223–253.

Caccioni DRL, Guizzardi M, Biondi DM, Renda A, Ruberto G. 1998. Relationship between volatile components of citrus essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Int. J. Food Microbiol.* 43:73–79.

Cáceres A, Figueroa L, Taracena AM, Samayoa B. 1993b. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 2: evaluation of 16 plants against Gram positive bacteria. *J. Ethnopharmacol.* 39:77-82.

Cáceres A, Fletes L, Aguilar L. 1993a. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. Confirmation of activity against enterobacteria of 16 plants. *J. Ethnopharmacol.* 38:31-38.

Callaway TR, Anderson RC, Edrington TS, Genovese KJ, Harvey RB, Poole TL. 2004. Recent pre-harvest supplementation strategies to reduce carriage and shedding of zoonotic enteric bacterial pathogens in food animals. *Ani. Health Res. Rev.* 5:35–47.

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science.* 263:802-805.

Charai M, Faid M, Mosaddak M. 1996. Chemical composition and antimicrobial activities of two aromatic plants: *Origanum majorana* L. and *O. compactum* Benth. *J. Essential Oil Res.* 8:657-664.

CLSI. 2009. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. M07-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.

Cowan MM. 1999. Plant products as anti-microbial agents. Clin.Microbiol. 12:564–582.

Cubitt AB, Heim R, Adams SR, Boyd AE, Gross LA, Tsien RY. 1995. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. Trend.Biochem. Sci. 20:448– 455.

Cuervo MP. 2007. Effect of natural antimicrobials against *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. Thesis (Master in Science). Texas A&M University. pp 54.

Davidson PM, Naidu AS. 2000. Phyto-phenols. In: A. S. Naidu (ed.). Natural food antimicrobial systems. CRC Press: Boca Raton, Fla., pp. 265–294.

Deans SG, Ritchie G. 1987. Antibacterial properties of plant essential oils. Int. J. Food Microbiol. 5:165-180.

Dorman HJD, Deans SG. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J. Appl. Microbiol. 88:308-316.

Doyle MP, Erickson MC. 2006. Reducing the carriage of foodborne pathogens in livestock and poultry. Poult. Sci. 85:960–973.

Doyle MP, Beuchat RL, Montville JT. 2001. Food Microbiology Fundamentals and frontiers. Second Edition. ASM Press: Washington, D.C.

Duke JA. 1985. Handbook of medicinal herbs. CRC Press: Inc. Boca Raton, Fla.

DuPont HL, Levine MM, Hornick RB, Formal SB. 1989. Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. J. Inf. Dis. 159:1126–1128.

Ebrahimi SN, Hadian J, Mirjalili MH, Sonboli A, Yousefzadi M. 2008. Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. Food Chem. 110:927- 931.

Ekdahl K, Andersson Y. 2005. The epidemiology of travel associated shigellosis – regional risks, seasonality and serogroups. J. Infect. 51:222–229.

Elder RO, Keen JE, Siragusa GR, Brarkocy-Gallagher GA, Koohmaraie M, Lagreid WW. 2000. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides and carcasses of beef cattle during processing. Proc. Natl. Acad. Sci. 97:2999–3003.

Elgayyar M, Draughon FA, Golden DA, Mount JR. 2001. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. J. Food Prot. 64:1019-1024.

Errampalli D, Leung K, Cassidy M, Kostrzynska M, Blears M, Lee H, Trevors J. 1999. Applications of the green fluorescent protein as a molecular marker in environmental microorganisms. J. Microbiol. Meth. 35:187–199.

ERS/USDA. 2001. Economics of food-borne disease: Estimating the benefits of reducing foodborne disease. United States Department of Agriculture, E.R.S. (ed.): Washington D. C. [Internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.ers.usda.gov/briefing/FoodborneDisease/features.htm> [Revisado el 03 de febrero de 2010]

Esimone CO, Iroha IR, Ibezim EC, Okeh CO, Okpana EM. 2006. *In vitro* evaluation of the interaction between tea extracts and penicillin G against *Staphylococcus aureus*. African J. Biotechnol. 5:1082-1086.

Ezzeddine NB, Abdelke MM, Ben Aissa R, Chaabouni MM. 2001. Antibacterial screening of *Origanum majorana* L. oil from Tunisia. J. Essential Oil Res. 13:295–297.

Fan M, Chen J. 2001. Studies on antimicrobial activity of extracts from thyme. Wei Sheng Wu Xue Bao. 41:499-504.

Favero JP, Nicolas CM, Benkirane M, Trave G, Dixon JFP, Aucouturier P. 1993. Inhibition of human immunodeficiency virus infection by the lectin jacalin and by a derived peptide showing a sequence similarity with GP120. Eur. J. Immunol. 23:179-185.

FDA (Food and Drug Administration). 2002. *Escherichia coli* O157:H7. Center for Food Safety & Applied Nutrition Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. [Internet]. Disponible en el sitio de red: <http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/chap15.html> [Revisado el 02 de enero de 2009].

Fernandez MA, Garcia MD, Saenz MT. 1996. Antibacterial activity of the phenolic acids fraction of *Scrophularia frutescens* and *Scrophularia sambucifolia*. J. Ethnopharmacol. 53:11-14.

Fessenden RJ, Fessenden J. S. 1982. Organic chemistry, 2nd ed. Willard Grant Press: Boston, Mass.

Fisher K, Phillips CA. 2006. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* *in vitro* and in food systems. J. Appl. Microbiol. 101:1232-40.

Fisher K, Philips CA. 2008. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?. Trends in Food Sci. & Technol. 19:156-164.

Frankel EN, Huang SW, Aeschbach R, Prior E. 1996. Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. J. Agri. Food Chem. 44:131-135.

Frankel EN, Huang SW, Aeschbach R, Prior E. 1997. Antioxidant activity of green teas in different lipid systems. J. American Oil Chem. Soc. 74:1309–1315.

Franz E, Visser AA, van Diepeningen AD, Klerks MM, Termorshuizen AJ, van Bruggen, AHC. 2007. Quantification of contamination of lettuce by GFP-expressing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* Typhimurium. Food Microbiol. 24:106–112.

FSIS/USDA. 2007. California firm expands recall of ground beef for possible *E. coli* O157:H7 contamination. [Internet]. Disponible en el sitio de red: http://www.fsis.usda.gov/News&Events/ExpandedRecall_025Release060907/index.asp [Revisado el 05 de febrero de 2010]

Fujioka T, Kashiwada Y. 1994. Anti-AIDS agents. Betulinic acid and platanic acid as anti-IV principles from *Syzygium claviflorum* and the anti- HIV activity of structurally related triterpenoids. J. Nat. Prod. 57:243-247.

Gadang V, Hettiarachchy N, Johnson M, Owens C. 2008. Evaluation of antibacterial activity of whey protein isolate coating incorporated with nisin, grape seed extract, malic acid, and EDTA on a turkey frankfurter system. J. Food Sci. 73:389-394.

Gahler S, Otto K, Böhm V. 2003. Alterations of vitamin C, total phenolics, and antioxidant capacity as affected by processing tomatoes to different products. J. Agri. Food Chem. 51:7962–7968.

Gill AO, Delaquis PJ, Russo P, Holley RA. 2002. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. Int. J. Food Microbiol. 73:83-92.

Gómez D, Miliwebsky E, Fernandez Pascua C, Baschkier A, Manfredi E, Zotta M, Nario F, Piquin A, Sanz M, Etcheverria A, Padola N, Parma A, Rivas M. 2002. Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* productora de verotoxina de hamburguesas congeladas y quesos blandos. Rev. Argent. Microbiol. 34:66-71.

Grauke LJ, Kudva IT, Yoon JW, Hunt CW, Williams CJ, Hovde C. 2002. Gastrointestinal tract location of *Escherichia coli* O157:H7 in ruminants. J. Appl. Environ. Microbiol. 68:2269-2277.

Gutiérrez J, Barry-Ryan C, Bourke P. 2008. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. Int. J. Food Microbiol. 124:91-97.

Gutierrez J, Barry-Ryan C, Bourke P. 2009. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. Food Microbiol. 26:142-150.

Hammer KA, Carson CF, Riley TV. 1996. Susceptibility of transient and commensal skin flora to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). Amer. J. Infect. Control 24:186-189.

Hammer KA, Carson CF, Riley TV. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J. Appl. Microbiol. 86:985-990.

Hammer KA, Carson CF, Riley TV. 2003. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. J. Appl. Microbiol. 95:853-860.

Helander IM, Alakomi HL, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Pol I, Smid EJ, Gorris LGM, Wright AV. 1998. Characterisation of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. J. Agri. Food Chem. 46:3590–3595.

Heymann DL. 2004. Control of Communicable Diseases Manual, 18th edn. Washington, DC: APHA. pp. 700.

Holley RA, Patel D. 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. Food Microbiol. 22:273–292.

Holzapfel WH, Geisen R, Schillinger U. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.* 24:343–362.

Hou L, Shi Y, Zhai P, Le G. 2007. Inhibition of foodborne pathogens by Hf-1, a novel antibacterial peptide from the larvae of the housefly (*Musca domestica*) in medium and orange juice. *Food Control.* 18:1350-1357.

Janda JM, Abbott SL. 2006. *The Enterobacteria*, 2nd edn. ASM: Washington, D.C., pp. 411.

Jay JM. 2000. *Modern Food Microbiology*. Sixth edition. Aspen Publishers Inc: Gaithersburg, Maryland.

Joerger RD. 2003. Alternatives to antibiotics: Bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poult. Sci.* 82:640–647.

Jones FA. 1996. Herbs-useful plants. Their role in history and today. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 8:1227–1231.

Juneja VK, Friedman M. 2008. Carvacrol and Cinnamaldehyde facilitate thermal destruction of *Escherichia coli* O157:H7 in raw ground beef. *J. Food Prot.* 71:1604-1611.

Kalchayanand N, Arthur T, Bosilevac J, Brichta-Harhay D, Guerini M, Shackelford S, Wheeler T, Koohmaraie M. 2009. Effectiveness of 1,3-dibromo-5,5 dimethylhydantoin on reduction of *Escherichia coli* O157:H7– and *Salmonella*-inoculated fresh meat. *J. Food Prot.* 72:151–156.

Kamatou GPP, Viljoen AM, van Vuuren SF, van Zyl RL. 2006. *In vitro* evidence of antimicrobial synergy between *Salvia chamelaeagnea* and *Leonotis leonurus*. South Afr. J. Bot. 72:634-636.

Karur P, Prasad R, Kumar V, Kumar A. 2006. Evaluation of antibacterial activity of Indian spices against common foodborne pathogens. Int. J. Food Sci. Technol. 42:910 – 915.

Koohmaraie M, Arthur TM, Bosilevac JM, Guerini M, Shackelford SD. and Wheeler T. L. 2005. Post-harvest interventions to reduce/eliminate pathogens in beef. Meat Sci. 71:79–91.

Kostrzynska M, Bachand A. 2006. Use of microbial antagonism to reduce pathogen levels on produce and meat products: A review. Can J. Microbiol. 52:1017–1026.

Lapidot T, Harel S, Akiri B, Granit R, Kanner J. 1999. pH-dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants. J. Agri. Food Chem. 47:67–70.

Lawless J. 1995. *The Illustrated Encyclopedia of Essential Oils*. Element Books Ltd: Shaftesbury, U.K.

Lee KA, Moon SH, Kim KT, Mendoca AF, Paik HD. 2010. Antimicrobial effects of various flavonoids on *Escherichia coli* O157:H7 cell growth and lipopolysaccharide production. Food Sci. Biotechnol. 19:257-261.

LeJeune JT, Wetzel AN. 2007. Preharvest control of *Escherichia coli* O157 in cattle. J. An. Sci. 85:73–80.

LeJeune JT, Besser TE, Rice DH, Berg RP, Stilborn DD. 2004. Longitudinal study of fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle: Predominance and persistence of specific clonal types despite massive population turnover. Appl. Environ. Microbiol. 70:377-384.

Lin YT, Labbe RG, Shetty K. 2004. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in fish and meat systems by use of oregano and cranberry phytochemical synergies. Appl. Environ. Microbiol. 9:5672–5678.

Lis-Balchin M, Deans SG. 1997. Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. J. Appl. Bacteriol. 82:759–762.

Lorang JM, Tuori RP, Martinez JP, Sawyer TL, Redman RS, Rollins JA, Wolpert TJ, Johnson KB, Rodriguez RJ, Dickman MB, Ciuffetti LM. 2001. Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. Appl. Environ. Microbiol. 67:1987–1994.

Luciano FB, Hosseinian FS, Beta T, Holley RA. 2008. Effect of free-SH containing compounds on allyl isothiocyanate antimicrobial activity against *Escherichia coli* O157:H7. J. Food Sci. 73:214-220.

Majhenic L, Kerget MS, Knez Z. 2007. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. Food Chem. 104:1258-1268.

Martínez MJ, Molina N, Bancourt E. 1997. Evaluación de la actividad antimicrobiana del *Psidium guajava* L. (guayaba). Rev. Cubana de Plant. Med. 2:12-14.

MDH. 2009. Causes and symptoms of Shigellosis. [Internet]. Minnesota Department of Health. Disponible en el sitio de red: <http://www.health.state.mn.us/divs/idepc/diseases/shigellosis/basics.html> [Revisado el 12 de febrero de 2009]

Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C. 1999. Food-related illness and death in the United States. Emerg. Infect. Dis. 5:607–625

Miles AA, Mishra SS. 1932. The estimation of the bactericidal power of the blood. J. Hig. 38:732.

Mishra AK, Dubey NK. 1994. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1101–1105.

Mohana DC, Satish S, Raveesha KA. 2008. Antibacterial evaluation of some plant extracts against some human pathogenic bacteria. *Adv. Biol. Res.* 2:49-55.

Monday SR, Weagant SD, Feng P. 2003. Use of endogenous host plasmids for generation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei* strains that stably express the green fluorescent protein. *Plasmid.* 50:161–167.

Moreira MR, Ponce AG, del Valle CE, Roura SI. 2005. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT - Food Sci. Technol.* 38:565-570.

Moreira MR, Ponce AG, del Valle CE, Roura SI. 2007. Effects of clove and tea tree oils on *Escherichia coli* O157:H7 in blanched spinach and mince cooked beef. *J. Food Process. Preserv.* 31:379-391.

Mourey A, Canillac N. 2002. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control* 13:289-292.

Nadarajah D, Han JH, Holley RA. 2005. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in packaged ground beef by allyl isothiocyanate. *Int. J. Food Microbiol.* 99:269–279.

NAPRALERT—Natural Products Alert. 1990. Illinois University, Chicago. [Internet]. Disponible en el sitio de red:
<http://www.uic.edu/pharmacy/depts/PCRPS/NAPRALERT.htm> [Revisado el 05 de febrero de 2010].

Nielsen ILF, Haren GR, Magnussen EL, Dragsted LO, Rasmussen SE. 2003. Quantification of anthocyanins in commercial black currant juices by simple high-performance liquid chromatography. Investigation of their pH stability and antioxidative potency. *J. Agri. Food Chem.* 51:5861–5866.

Niyogi SK. 2005. Shigellosis. *J. Microbiol.* 43:133–143.

Noah CW, Shaw CI, Ikeda JS, Kreuzer KS, Sofos JN. 2005. Development of green fluorescent protein-expressing bacterial strains and evaluation for potential use as positive controls in sample analyses. *J. Food Prot.* 68:680–686.

Northcutt JK, Smith DP, Musgrove MT, Ingram KD, Hinton AJr. 2005. Microbiological impact of spray washing broiler carcasses using different chlorine concentrations and water temperatures. *Poult. Sci.* 84:1648–1652.

O’Kennedy R, Thornes RD. (ed.). 1997. Coumarins: biology, applications and mode of action. John Wiley & Sons, Inc: New York.

Omulokoli E, Khan B, Chhabra SC. 1997. Antiplasmodial activity of four Kenyan medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 56:133-137.

Oquendo M. 2006. Incidencia de *Escherichia coli* serotipo O157:H7 en carne proveniente de ganado bovino de mataderos de Puerto Rico. Tesis (Master of Science). Universidad de Puerto Rico.

Padola NL, Sanz ME, Blanco JE, Blanco M, Blanco J, Etcheverria AI, Arroyo GH, Usera MA, Parma AE. 2004. Serotypes and virulence genes of bovine Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from a feedlot in Argentina. *Vet. Microbiol.* 100:3-9.

Parekh J, Jadeja D, Chanda S. 2005. Efficacy of aqueous and methanol extracts of some medicinal plants for potential antibacterial activity. *Turk. J. Bio.* 29:203-210.

Paton JC, Paton AW. 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:450-479.

Payton-Pruett W, Biela T, Lattuada CP, Mrozinski PM, Barbour MW, Flowers RS, Osborne W, Reagan JO, Theno D, Cook V, Mcnamara A, Rose B. 2002. Incidence of

Escherichia coli O157:H7 in frozen beef patties produced over an 8-hour shift. J. Food Prot. 65:1363-1370.

Peacock E, Jacob VW, Fallone SM. 2001. *Escherichia coli* O157:H7: etiology, clinical features, complications, and treatment. Nephrol. Nurs. J. 28:547-57.

Pearce MC, Fenlon D, Low JC, Smith AW, Knight HI, Evans J, Fostes G, Synge BA, Gunn GJ. 2004. Distribution of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine fecal pats and its impact on estimates of the prevalence of fecal shedding. J. Appl. Environ. Microbiol. 70:5737-5743.

Pei RS, Zhou F, Ji BP, Xu J. 2009. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. J. Food Sci. 74:379-383.

Ponce AG, Moreira MR, del Valle CE, Roura SI. 2008. Preliminary characterization of bacteriocin-like substances from lactic acid bacteria isolated from organic leafy vegetables. LWT- Food Sci. Technol. 41:432-441.

Ponce E, Velasco P, Flores E, Genevieve B, Giménez A. 1998. Evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana de plantas medicinales utilizadas por la etnia tacana. Biofarbo. 6:27.

Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendgast FG, Cormier MJ. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. Gene. 111:229-233.

Qaralleh HN, Abboud MM, Khleifat KM, Tarawneh KA, Althunibat OY. 2009. Antibacterial activity *in vitro* of *Thymus capitatus* from Jordan. Pak. J. Pharm. Sci. 22:247-251.

Rasooli I, Rezaei MB, Allameh A. 2006. Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. Int. J. Infect. Dis. 10:236-241.

Ravikumar Patil HS, Makari HK, Gurumurthy H. 2007. *In vitro* antimicrobial activity of ethanol extract of *Thevetia peruviana* . EJEAF Che. 6:2318-2322.

Reynolds JEF. 1996. Martindale – the Extra Pharmacopoeia 31st edn. Royal Pharma. Soc. of Great Britain: London.

Richheimer SL, Bernart MW, King GA, Kent MC, Bailey DT. 1996. Antioxidant activity of lipid soluble phenolic diterpenes from rosemary. J. Am. Oil Chem. Soc. 73:507–514.

Rojas MA. 2006. Recubrimientos comestibles y sustancias de origen natural en manzana fresca cortada: Una nueva estrategia de conservación. Tesis. (PhD). Universitat de Lleida.

Sandasi M, Leonard C, Viljoen A. 2008. The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. Food Control. 19:1070-1075.

Scalbert A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. Phytochem. 30:3875-3883.

Scott K, Mercer D, Glover A, Flint H. 1998. The green fluorescent protein as a visible marker for lactic acid bacteria in complex ecosystems. FEMS Microbiol. Ecol. 26:219–230.

Sharon N, Ofek I. 1986. Mannose specific bacterial surface lectins, In: Mirelman D (ed.) Microbial lectins and agglutinins. John Wiley & Sons Inc: New York, pp. 55-82.

Shin S, Kang CA. 2003. Antifungal activity of the essential oil of *Agastache rugosa* Kuntze and its synergism with ketoconazole. Lett. Appl. Microbiol. 36:111–115.

Singh G, Kapoor I, Singh P, Heluani C, Lampasona M. 2008. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. Food Chem. Toxicol. 46:3295-3302.

Skandamis P, Tsigarida E, Nychas GJE. 2002. The effect of oregano essential oil on the survival/death of *Salmonella Typhimurium* in meat stored at 5°C under aerobic, VP/MAP conditions. Food Microbiol. 19:97–103.

Smid EJ, Gorris LG. M. 1999. Natural antimicrobials for food preservation. In: Rahman MS, Dekker M, (eds). Handbook of food preservation. Marcel Dekker Inc: New York, pp 285–308.

Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. Lett. Food Microbiol. 26:118-122.

Stanojević D, Čomić L, Stefanović O. 2010. Synergy between *Salvia officinalis* L. and some preservatives. Cent. Eur. J. Biol. 5:491–495.

Stefanovic O, Stanojevic D, Comic L. 2009. Inhibitory effect of *Torilis anthriscus* on growth of microorganisms. Cent. Eur. J. Biol. 4:493–498.

Stern JL, Hagerman A, Steinberg E, Mason PK. 1996. Phlorotannin-protein interactions. J. Chem. Ecol. 22:1887-1899.

Sur D, Ramamurthy T, Deen J, Bhattacharya SK. 2004. Shigellosis: challenges & management issues. In. J. Med. Res. 120:454–462.

Suresh K, Saravana Babu S, Harisaranraj R. 2008. Studies on *in vitro* antimicrobial activity of ethanol extract of *Rauvolfia tetraphylla*. Ethnobot. Leaf. 12:586-90.

Tamblyn KC, Conner DE. 1997. Bactericidal activity of organic acids against *Salmonella Typhimurium* attached to broiler chicken skin. J. Food Prot. 60:629-633.

Tassou CC, Nychas GJE. 1996. Antimicrobial activity of essential oil of mastic gum on Gram positive and Gram negative bacteria in broth and in model food system. *Int. Biodeterior. Biodeg.* 14:411–420.

Tepe B, Donmez E, Unlu M, Candan F, Daferera D, Vardar-Unlu G. 2004 Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (montbret et aucher ex benth.) and *Salvia multicaulis* (vahl). *Food Chem.* 84:519–525.

Thomson WAR. (ed.). 1978. *Medicines from the Earth*. McGraw-Hill Book Co: Maidenhead, United Kingdom.

Tsuchiya H, Sato M, Miyazaki T, Fujiwara S, Fanigaki S, Ohyama M. 1996. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol.* 50:27-34.

Valero M, Frances E. 2006. Synergistic bacteriocidal effect of carvacrol, cinnamaldehyde or thymol and refrigeration to inhibit *Bacillus cereus* in carrot broth. *Food Microbiol.* 23:68–73.

Valero M, Giner MJ. 2006. Effects of antimicrobial on growth of *Bacillus cereus* INRA L2104 in and the sensory qualities of carrot broth. *Int J. Food Microbiol.* 106:90–94.

Valtierra-Rodriguez D, Heredia NL, García S, Sánchez E. 2009. Reduction of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in poultry skin by fruit extracts. *J. Food Prot.* 73:477-482.

Vialette M, Jandos-Rudnik AM, Guyard C, Legeay O, Pinon A, Lange M. 2004. Validating the use of green fluorescent-marked *Escherichia coli* O157:H7 for assessing the organism behaviour in foods. *J. Appl. Microbiol.* 96:1097–1104.

Vieira RHSE, Rodrigues DP, Gonçalves FA. 2001. Microbicidal effect of medicinal plant extracts (*Psidium guajava* Linn. and *Carica papaya* Linn.) upon bacteria isolated

from fish muscle and known to induce diarrhea in children. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 43:145-148.

Vukovic N, Milosevic T, Sukdolak S, Solujic S. 2007. Antimicrobial activities of essential oil and methanol extract of *Teucrium montanum*. eCAM. 4:17–20.

Wada S, Fang X. 1992. The synergistic antioxidant effect of rosemary extract and α -tocopherol in sardine oil model system and frozen-crushed fish meat. J. Food Process. Preserv. 195:95–98.

WHO. 1999. Basic food safety for health workers. World Health Organization: Geneva, Switzerland.

WHO. 2005. Guidelines for the Control of Shigellosis, including Epidemics due to *Shigella dysenteriae*, 1. World Health Organization: Geneva, Switzerland.

Wild R. (ed.) 1994. The complete book of natural and medicinal cures. Rodale Press: Inc. Emmaus, Pa.

Xujian Q, Wu VCH. 2007. Evaluation of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in ground beef with cranberry concentrate by thin agar layer method. J. Rap. Meth. Autom. Microbiol. 15:282-294.

Ya C, Gaffney SH, Lilley TH, Haslam E. 1988. Carbohydrate–polyphenol complexation. p. In: Hemingway RW and Karchesy JJ. (eds.). Chemistry and significance of condensed tannins. Plenum Press: New York.

Zhang Y, Lewis K. 1997. Fabatins: new antimicrobial plant peptides. EE MS Microbiol. Lett. 149:59-64.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

José Macario Padilla Garza

Candidato para el Grado de:

Maestro en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Tesis: EFECTO DE MEZCLAS DE EXTRACTOS DE PLANTAS SOBRE LA PRESENCIA DE *Escherichia coli* O157:H7 Y *Shigella sonnei* EN CARNE DE RES CONTAMINADA ARTIFICIALMENTE

Campo de Estudio: Productos Naturales e Inocuidad Alimentaria.

Datos Personales: Nacido en San Pedro Garza García el 7 de abril de 1983, hijo de Lucía Garza López y Macario Padilla Venegas.

Reconocimientos: Al Mérito Académico UANL, 14 de Septiembre de 2005, a la EXCELENCIA ACADEMICA Federación de Colegios Profesionales del Estado de Nuevo León, A.C., 26 de Enero de 2006.

Educación: Egresado de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Ingeniero en Industrias Alimentarias, 2006.

Experiencia Profesional: Jefe del Área de Bromatología LCR de M, Gerente de Proceso Empacadora de Hortalizas Linares. Responsable de Inocuidad Orval Kent de Linares S.A de C.V. Coordinador del Programa de Inocuidad de Alimentos CESAVENL.

